

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur
Et de la recherche scientifique
Université Mouloud MAMMERY
FACULTÉ DE MÉDECINE
Département de pharmacie
TIZI OUZOU

وزارة التعليم العالي
جامعة مولود معمري كلية الطب
تيزي وزو



ⵜⴰⴳⴷⴰⵢⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵎⴻⵔⴰⵏⵜ ⵜⴰⵖⴻⵔⴰⵏⵜ



MEMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

N° D'ORDRE :

Présenté et soutenu publiquement

Le : 09juillet 2019

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

**MISE AU POINT ET VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE
DE FUROSEMIDE DANS DES COMPRIMES DE 40 mg PAR LA
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE**

Thème :

Réalisé par :

SLIMANI Silia

ZALOUK Thiziri

ZERBOUT Hocine

Composition de jury :

Pr GHARBI. A

Professeur

USDB

Président du jury

Pr MAMOU. M

MCAHU

UMMTO

Promoteur

Dr AKLI.K

RCA

UMMTO

Co-promotrice

Dr BEN SI SAID. H

MAHU

UMMTO

Examineur

Dr AKROUM.A

RCA

UMMTO

Co-promoteur

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018/2019

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu source de toute connaissance

Nous voudrions aussi remercier très sincèrement notre promoteur Professeur MAMOU.M maitre de conférence hospitalo-universitaire en Chimie-Analytique au département pharmacie de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou pour nous avoir encadré, suivi, conseillé et aidé durant ce mémoire.

Nous tenons à remercier énormément Docteur AKLI.K résidente en chimie analytique au niveau du CHU Tizi – Ouzou /UMMTO pour sa disponibilité, ses conseils précieux tout au long de ce travail ainsi que pour sa grande patience. Nous n'oublierons pas votre gentillesse et soutien, son caractère très accueillant qui nous a permis de surmonter les difficultés rencontrées.

Nous remercions également Docteur AKROUM.A résident en chimie analytique au niveau du CHU Tizi – Ouzou /UMMTO pour ces encouragements et son incontestable contribution à l'accomplissement de ce travail.

Nous ne manquons pas l'occasion de remercier chaleureusement le LNCPP à leur tête Professeur GHERBI, de nous avoir fournis la matière première. Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre reconnaissance.

Merci aux membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant dévaluer et examiner notre travail.

Nous remercions aussi le chef de département Dr KESSAL, ainsi que tous les enseignants de notre cursus

Dédicaces

Ma vie extérieure et intérieure dépend du travail de mes contemporains et de celui de mes ancêtres, je dois m'efforcer de leurs fournir la même proportion de ce que j'ai reçu et que je reçois encore... (ALBERTEINSTEIN)

Je dédie ce modeste travail :

*A celle qui a veillé pour que j'arrive là où je suis, celle qui m'a encouragé durant toute ma vie et elle m'a donné l'espoir de poursuivre ce chemin jusqu'au bout ...**MAMAN***

*A ma bougie de vie qui se brule pour éclaircir mon chemin, qui ne m'a rien refusé pour que je réussisse, mon cher **père**, pour qui l'honneur d'être sa fille me suffit*

*A mon seul et unique frère **MEROUANE** et sa femme **KAMELYA** qui n'ont jamais cessé de me soutenir et m'encourager*

A mes grands-mères qui m'ont toujours aimé et comblé par leurs bénédictions, que dieu le tout puissant les garde pour moi

A la mémoire de mes grands-pères, j'aurais tant aimé que vous soyez présents, que dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde

Mes chers oncles, tantes que ce soit paternels ou maternels ainsi que leurs familles

*A mes cousins, cousines : **Slimane, Moussa, Amine, Sarah, Hadjira, Siham, Meriem, Ferial, Lyna ...***

*A toute la famille **SLIMANI** et **ALOUANE***

*A mes chers amis : **Thiziri , Nabila , Dyhia , Litice , Sissou , Nihal , Sofyane , Kami , karima** qui m'ont toujours écoutés , soutenus et encouragé , et plus particulièrement **Djidji et Katia***

*A mes chers trinômes **ZALOUK THIZIRI, ZERBOUT HOCINE** et toute la promotion de **PHARMACIE 2013\2014***

A tous ceux qui me sont trop chers et que j'ai omis de citer et à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à l'élaboration de ce travail

SLIMANI SILIA

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes **chers parents** qui m'ont élevé, qui ont toujours été là pour satisfaire tous mes besoins quels qu'ils soient, qui m'ont toujours soutenu, encouragé à y aller de l'avant, qui m'ont écouté qui ont su être là pour moi dans toutes situations. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez sacrifié pour moi depuis ma naissance ; des milliers de mots seront toujours peu pour vous. Merci

A la mémoire de **mes grands-parents maternels** lah irhemhom que dieu vous accueille dans son vaste paradis j'aurai aimé si vous étiez là

A **mes grands-parents** paternels, vous vous êtes toujours souciés de moi ; que dieu vous garde pour nous

A mon adorable sœur **Dihya**, et mon cher frère **Mazigh**. Je vous souhaite beaucoup de réussite

A mes cousins et cousines qui cherchaient à avoir mes nouvelles **kahina, Lydia, Lounas, Sabrina, Lynda, Naoual, Ahcène, Rezika, Merzouk, Moumouh....** Je vous remercie

A mes oncles et tantes qui cherchent derrière ma réussite. Merci à vous

A mes chers amis et amies : **Sissi, Lydia, Said, Danny, Malek, Yara, Nesrine, Farida, Karima, Sissou, Lamy....**vous n'êtes pas nombreux mais vous êtes si chers pour moi particulièrement mon cher ami **Sofiane** qui m'a encouragé à travailler d'avantage, qui a su m'écouter me plaindre sans s'ennuyer, qui était prêt à m'aider dans tout ce que je fais.

A mes trinômes **Hocine** et ma chère copine **Sissi**. C'était un plaisir d'avoir vécu ce cursus étant votre amie

A tous mes camarades de promo

ZALOUK THIZIRI

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère maman Malika,

A mon très cher père Ahmed

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

Puisse Dieu, le très Haut, vous accorde santé, bonté, longue vie Inshallah et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

A mon cher jumeau Ahcène, et mon petit frère Nadir.

En témoignage de mon affection fraternelle, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A ma chère grand mère paternelle

Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur dans les deux vies.

A la mémoire de mes grands-parents maternels et mon grand père paternel

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

A Mes chers oncles, tantes que ce soit paternels ou maternels ainsi que leurs familles.

A mes chers cousins et cousines : Rafik, Sabrina, Nounou, Farouk, Ania, Ravane, Sarah

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A toute la famille ZERBOUT&OULD KACI.

A mes chers amis et amies : Farouk, Messaoud, Madjid, Yacine, Youssef, Kamel, Doudou, Imane, Kahina, Sonia et tous mes collègues de la promo PHARMACIE.

A mes trinômes : ZaloukThiziri, Slimani Silia ensemble nous avons pu mener ce travail à terme.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

ZERBOUT HOCINE

TABLE DES MATIERES

Table de matière.....	I
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Introduction générale.....	01
Objectif.....	03

Partie théorique

Chapitre I : Furosémide

1. Définition	04
2. Propriétés organoleptiques.....	04
3. Propriétés physicochimiques.....	04
4. Propriétés pharmacologiques.....	05
4.1. Propriétés pharmacocinétiques.....	05
5.1.1. Absorption.....	05
5.1.2. Distribution.....	05
5.1.3. Métabolisme.....	06
5.1.4. Elimination.....	06
4.2. Propriétés pharmacodynamiques et mécanisme d'action.....	06
4.3. Indications.....	07
5. Toxicité	07

Chapitre II : Validation analytique

1. Définition.....	08
2. Buts.....	08
3. Quelles procédures analytiques valider ?.....	09
4. Aspects réglementaires.	09
4.1. Documents ISO 17025.....	09
4.2. Documents ISO 5705.....	09
4.3. Documents FDA	10
4.4. Documents AFNOR (normes AFNOR NF V 03-110).....	10
4.5. Documents ICH.....	10
4.6. Documents des commissions SFSTP.....	10
5. Critères de validation.....	11

TABLE DES MATIERES

5.1. Spécificité (sélectivité).....	12
5.2. Fonction de réponse.	12
5.3. Linéarité.....	12
5.4. Fidélité.....	12
5.5. Justesse	13
5.6. Exactitude	13
5.7. Limite de détection (LD).....	14
5.8. Limite de quantification (LQ).....	14
5.9. Intervalle de dosage	14
5.10. Sensibilité.....	14
5.11. Robustesse	14
6. Le choix des critères de validation	14
7. Protocol de la validation	15
8. Etude statistique	18
8.1. Spécificité	18
8.2. Fonction de réponse.....	18
8.3. Alignement des observations	19
8.4. Prédications inverses	20
8.5. Linéarité	21
8.6. Justesse et de la fidélité.....	21
8.6.1. Modèle de calcul	21
8.6.2. Justesse	22
8.6.3. Fidélité.....	23
8.7. Exactitude	23
8.8. Erreur total et le profil d'erreur total.....	23
8.8.1. Calcul de l'intervalle de tolérance	24
8.8.2. Profil d'exactitude	25

Chapitre III : Comprimés

1. Définition du comprimé.....	27
2. Différents aspects des comprimés.....	27
2.1. Comprimé à libération conventionnel (immédiate).....	27
2.1.1. Comprimés nus ou non enrobés.....	27

TABLE DES MATIERES

2.1.2. Comprimés enrobés.....	27
2.2. Comprimés à libération modifiée.....	28
2.2.1. Comprimés à libération prolongée.....	28
2.2.2. Comprimés à libération retardée.....	28
2.2.3. Comprimés à libération accélérée.....	28
2.2.4. Comprimés à utiliser dans la cavité buccale.....	28
3. Caractéristiques organoleptiques des comprimés.....	29
3.1. Formes et dimensions.....	29
3.2. Couleurs et marquage.....	29
3.3. Structure.....	30
4. Composition des comprimés.....	30
4.1. Principes actifs.....	30
4.2. Principaux excipients.....	30
5. Fabrication des comprimés.....	31
6. Contrôles effectués	31
6.1. Contrôle en cours de fabrication.....	31
6.2. Contrôle en fin de fabrication.....	31
6.2.1. Uniformité de masse.....	31
6.2.2. Uniformité de teneur.....	32
6.2.3. Désagrégation.....	32
6.2.4. Résistance à la rupture.....	32
6.2.5. Fiabilité.....	32
6.2.6. Essai de dissolution.....	32
7. Avantages et inconvénients.....	33
8. Les comprimés de furosémide	33

Partie pratique

1. Matériel et méthodes.....	34
1.1. Matériel.....	34
1.1.1. Matières premières.....	34
1.1.2. réactifs.....	34
1.1.3. Appareillages et équipements.....	34
1.1.4. Verrerie et autres.....	35

TABLE DES MATIERES

1.2. Méthodes	36
1.2.1. Méthodologie de la validation analytique.....	36
1.2.2. Choix du protocole de validation.....	37
1.2.3. Choix des paramètres de validation.....	37
1.2.3.1. Domaines d'application et niveaux de concentration.....	37
1.2.3.2. Limites d'acceptabilité.....	37
1.2.3.3. Probabilité de confiance.....	37
1.2.3.4. Conditions expérimentales.....	38
A. Le choix de la dilution.....	38
B. Le choix du diluant.....	38
1.2.3.5. Préparation des solutions.....	38
A. Préparation du diluant.....	38
B. Préparation des standards d'étalonnage	38
C. Préparation des standards de validation.....	39
D. Préparation du placebo.....	39
E. Préparation de la phase mobile.....	39
F. Préparation des solutions pour l'étude de robustesse.....	40
G. Préparation des solutions pour l'étude de stabilité.....	40
1.2.3.6. Conditions chromatographiques.....	40
1.2.4. Préparation de la feuille de calcul.....	41
2. Résultats	42
2.1. Spécificité et effet de matrice	42
2.1.1. Comparaison des chromatogrammes.....	42
2.1.2. Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation.....	43
2.1.3. Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique.....	45
2.2. Fonction de réponse	45
2.2.1. Critères de choix de la fonction de réponse.....	53
2.3. Alignement des observations.....	56
2.4. Prédiction inverses	58
2.5. Justesse.....	60
2.6. Fidélité.....	60
2.7. Exactitude.....	61

TABLE DES MATIERES

2.8. Erreur totale et profil d'erreur totale.....	63
2.9. Intervalle de tolérance.....	63
2.10. Profil d'exactitude.....	63
2.11. Linéarité.....	64
2.12. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	65
2.13. Robustesse.....	65
2.14. Stabilité des solutions.....	67
3. Discussion	68
3.1. Spécificité.....	69
3.2. Choix de la fonction de réponse	69
3.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie	70
3.3.1. Justesse	70
3.3.2. Fidélité	70
3.4. Critères de décision sur la validité de la méthode analytique	70
3.4.1. Erreur totale.....	70
3.4.2. Profil d'exactitude	70
3.4.3. Limites de quantification et intervalle de dosage.....	71
3.5 Linéarité	71
3.6 Robustesse.....	71
3.7 Stabilité des solutions	71
Conclusion générale.....	73
Perspectives.....	74
Références bibliographiques.....	
Annexes	
Résumé.....	
Abstract.....	

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	Sens de l'abréviation
AFNOR	Association française de normalisation
CMC	carboxyméthylcellulose
CPG	Chromatographie de phase gazeuse
DL ₅₀	Dose létale a 50%
EEN	Excipients à effet notoire
FDA	Food and drug administration
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
ICH	International Conference on Harmonization
ISO	International Organisation For Standardization
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
RSD	Relative Standard Deviation
SE	Standard d'étalonnage
SFSTP	Société française des sciences techniques et pharmaceutiques
SV	Standard de validation
USP	Pharmacopée américaine
UV	Ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Structure chimique du furosémide	04
Figure 2	Mécanisme d'action de furosémide	07
Figure 3	Logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation	17
Figure 4	La différence entre linéarité et fonction de réponse	22
Figure 5	Représentation schématique de l'exactitude	24
Figure 6	Chromatogramme du diluant non chargé de PA	42
Figure 7	Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA	42
Figure 8	Chromatogramme du standard d'étalonnage	42
Figure 9	Chromatogramme du standard de validation	42
Figure 10	Courbe de fonction de réponse $y=ax+b$	47
Figure 11	Courbe de fonction de réponse $\ln y=f(\ln x)$	49
Figure 12	Courbe de fonction de réponse $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	51
Figure 13	Courbe de fonction de réponse $y=ax$	53
Figure 14	Courbe du profil d'exactitude avec la fonction $y = ax+b$	54
Figure 15	Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$	54
Figure 16	Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$	55
Figure 17	Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $y= ax$	55
Figure 18	Tracé du profil d'exactitude pour la fonction $y=ax+b$	64
Figure 19	Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y=ax+b$	64

LISTE DES TABLEAUX

Numéro du tableau	Titre	Page
Tableau I	Propriétés physicochimiques du furosémide	05
Tableau II	DL ₅₀ du furosémide chez l'espèce	07
Tableau III	Critères de la validation en fonction du type d'analyse	11
Tableau IV	Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi.	18
Tableau V	Exemples de fonction de réponses	19
Tableau VI	Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses	20
Tableau VII	Calcul des prédictions inverses pour différentes fonction de réponses	20
Tableau VIII	Avantages et inconvénients des comprimés	33
Tableau IX	Matières premières utilisées	34
Tableau X	Réactifs utilisés	34
Tableau XI	Appareillages utilisés	35
Tableau XII	Verreries et autres matériels utilisés	36
Tableau XIII	Conditions chromatographiques de la méthode de dosage	40
Tableau XIV	Résultats obtenus sur la gamme SE	43
Tableau XV	Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme SE	43
Tableau XVI	Résultats obtenus sur la gamme SV	44
Tableau XVII	Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme SV	44
Tableau XVIII	Comparaison de deux pentes	45
Tableau XIX	Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$	46
Tableau XX	Résultats obtenus pour la fonction $\text{Ln } y=f(\text{Ln}x)$	48
Tableau XXI	Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$	50
Tableau XXII	Résultats obtenus pour la fonction $y=ax$	52
Tableau XXIII	Alignement des observations	57
Tableau XXIV	Prédictions inverses obtenues avec le SV	59
Tableau XXV	Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.	60
Tableau XXVI	Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.	61
Tableau XXVII	Résultats de calcul de l'exactitude	62
Tableau XXVIII	Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation	63
Tableau XXIX	Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.	63
Tableau XXX	Masses prédites en fonction des masses introduites	65
Tableau XXXI	Résultats de l'étude de la robustesse.	66
Tableau XXXII	Résultats de l'étude de la stabilité	67
Tableau XXXIII	Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnés à l'origine entre elles.	68
Tableau XXXIV	Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards d'étalonnage	39
Tableau XXXV	Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards de validation	39

Introduction

INTRODUCTION

Les diurétiques de l'anse sont les plus puissants des diurétiques, leur effet est corrélé à la dose, à ce titre ils peuvent être utilisés dans des situations d'urgences dans lesquelles la déplétion hydrosodée rapide est nécessaire comme dans l'œdème aigu du poumon. Leur indication principale est la surcharge hydrosodée.

Parmi ces médicaments, figure le furosémide. C'est un diurétique de l'anse, largement prescrit dans le traitement des œdèmes et de l'hypertension artérielle. Son mode d'action consiste à inhiber la résorption du sodium au niveau de l'anse de Henlé plus précisément au niveau de la branche ascendante.

Le dosage du furosémide dans les produits pharmaceutiques s'effectue habituellement par spectrophotométrie UV-VISIBLE. Cette méthode connue pour sa simplicité et sa rapidité d'exécution n'est pas dépourvue d'inconvénients, sa limite principale consiste en son manque de spécificité. Afin de palier à cette insuffisance les méthodes chromatographiques occupent une place primordiale [2]

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) connue pour ses nombreux avantages tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif, offre entre autres une meilleure sélectivité. Toute la problématique se pose dans l'étape de la mise au point ; notamment le choix des phases mobiles et stationnaires ainsi que des conditions expérimentales ; et l'étape de la validation analytique.

Cependant, toute nouvelle méthode mise au point doit faire objet d'une validation complète conformément aux guides et aux textes réglementaires en vigueur. La validation analytique occupe une place incontournable en contrôle qualité et elle constitue un élément fondamental dans le système d'assurance qualité.

Afin d'aider les industriels à valider concrètement leurs méthodes analytiques, des commissions techniques de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques ont élaboré plusieurs guides, le dernier publié en 2006 porte sur le profil d'exactitude et le calcul de l'erreur totale. Ce guide constitue le support de notre validation.

Afin de répondre clairement à la problématique posée et de valider la méthode du dosage du furosémide par HPLC, notre manuscrit est réparti en deux (02) parties.

INTRODUCTION

La première partie concerne une revue de la littérature ou partie théorique, elle est subdivisée en trois (03) chapitres ;

- Dans le premier chapitre, nous traiteront les principales propriétés physicochimiques, pharmacologiques et toxicologiques du furosémide.
- Le deuxième chapitre est dédié à la validation analytique dans ses aspects réglementaires et protocoles expérimentaux.
- Le furosémide étant dosé dans la forme pharmaceutique « comprimé », le troisième chapitre traitera brièvement de cette forme galénique.

La seconde partie de ce manuscrit est réservée à la partie expérimentale, nous présenterons dans un premier temps le matériel et les méthodes du travail, puis nous exposerons nos résultats suivis des discussions et en fin nous terminerons avec une conclusion quant à la validité de la méthode de dosage du furosémide dans les comprimés de 40 mg.

Objectifs

OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail est de mettre au point et de valider une nouvelle méthode de dosage du Furosémide dans des comprimés de 40 mg par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Outre cet objectif principal, des objectifs secondaires sont définis comme suit ;

- Préparation des solutions en vue d'une analyse par HPLC (diluants, phases mobiles, solutions standards et échantillons).
- Réalisation des feuilles de calculs afin d'étudier les critères de validation.
- Utilisation des équipements analytiques notamment une chaîne HPLC en vue de contrôle qualité des médicaments et l'exploitation des résultats.
- Etude de stabilité des solutions de furosémide dans les différentes conditions de conservation.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I

CHAPITRE I : FUROSEMIDE

Le furosémide est un diurétique de l'anse ; il agit au niveau du rein en favorisant l'élimination d'eau de l'organisme. Il est essentiellement préconisé en cas d'accumulation excessive d'eau dans le corps appelé œdèmes qui peuvent être d'origine cardiaque, rénale ou hépatique. Il est également utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle.

1. Définition

Acide 4-chloro-2-[(furan-2-ylméthyl) amino]-5-sulfamoylbenzoïque.

Teneur : 98,5 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée). [1] [2]

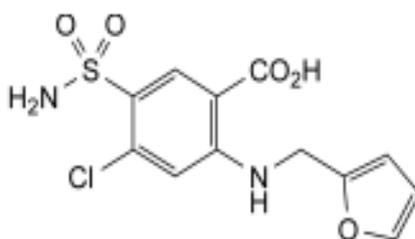


Figure 01 : structure chimique du furosémide [3]

2. Propriétés organoleptiques

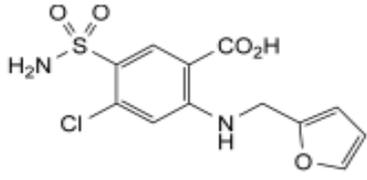
Le furosémide se présente sous forme de poudre cristalline inodore blanche ou presque blanche et pratiquement insipide [4].

3. Propriétés physicochimiques

Les propriétés physicochimiques de Furosémide sont résumées dans le tableau I

CHAPITRE I : FUROSEMIDE

Tableau I : Propriétés physicochimiques du furosémide [1][2]

IUPAC	Acide 4-chloro-2-[(furan-2-ylméthyl)amino]-5-sulfamoylbenzoïque.
Formule chimique brute	$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$
Formule chimique développée	
Masse molaire	330,70g/mol
Température de fusion	Environ 210 °C
Solubilité	-insoluble dans l'eau et dans le chlorure de méthylène -Soluble dans l'acétone et assez soluble dans l'éthanol à 96% -Se dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins

4. Propriétés pharmacologiques

4.1. Propriétés Pharmacocinétique

4.1.1. Absorption

La résorption digestive du furosémide est rapide mais incomplète ; elle est ralentie mais non diminuée par la présence des aliments. La concentration plasmatique maximale du principe actif est obtenue environ en 60minutes. [5]

4.1.2. Distribution

La liaison de notre médicament aux protéines plasmatiques est de 96 à 98%. Son volume de distribution apparent est de 0.150l/kg. [5]

CHAPITRE I : FUROSEMIDE

4.1.3. Métabolisme

Une faible partie du furosémide résorbée est inactivée par glycuconjugaison hépatique et sans doute rénale. [5]

4.1.4. Elimination

La demi-vie d'élimination du furosémide est d'environ 50 minutes. Sa clairance plasmatique se situe entre 2 et 3ml/min/kg ; elle résulte d'une élimination urinaire et digestive (en partie biliaire). L'élimination urinaire, nettement prépondérante, est rapide et porte essentiellement sur du furosémide sous forme active. [5]

4.2. Propriétés pharmacodynamie et mécanisme d'action

Le furosémide est un diurétique de l'anse.

Action salidiurétique : le furosémide, aux doses thérapeutiques habituelles, agit principalement au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé où il inhibe la réabsorption du chlore et, par la suite, du sodium. Il possède une action accessoire au niveau du tube proximal et du segment de dilution. Il augmente le flux sanguin rénal au profit de la zone corticale. L'action salidiurétique croît proportionnellement aux doses administrées et persiste en cas d'insuffisance rénale [5].

Action anti hypertensive et autres actions : le furosémide possède une action hémodynamique se caractérisant par la diminution de la pression capillaire pulmonaire avant même l'apparition de toute diurèse. Le furosémide traite toutes les formes de rétention hydrosodée avec une réponse proportionnelle à la dose. Le furosémide exerce une action anti hypertensive qui résulte à la fois de la déplétion sodée et de l'action hémodynamique [5]

CHAPITRE I : FUROSEMIDE

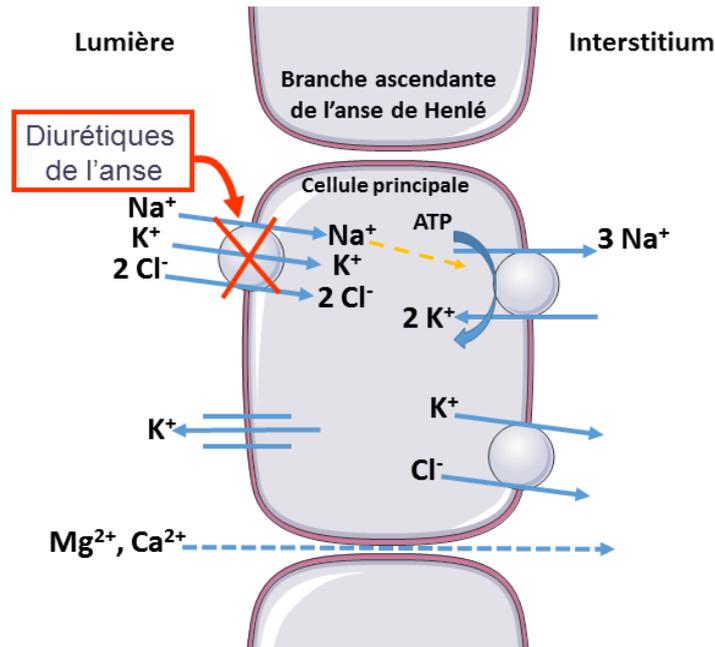


Figure 02 : mécanisme d'action du Furosémide [6]

4.3. Indications

Le furosémide est un diurétique utilisé dans les cas suivants [5] :

- ✓ Œdèmes d'origine cardiaque ou rénale.
- ✓ Œdèmes d'origine hépatique, le plus souvent en association avec un diurétique épargneur de potassium.
- ✓ Hypertension artérielle

5. Toxicité

Tableau II : DL₅₀ De Furosémide chez l'espèce animale [7]

Espèce animale	DL ₅₀ (voie oral)
Souris	2.108g/kg
Rat	2.20g/kg

Les signes d'intoxication aigue chez la souris et le rat comprennent une augmentation marquée du tonus musculaire, un ptosis prononcé, des spasmes musculaires graves, une dépression modérée du SNC et des convulsions cloniques aigues. [7]

Chapitre II

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

La validation d'une méthode analytique est un concept appliqué dans tous les domaines d'industries pharmaceutiques, biopharmaceutiques, chimiques, agroalimentaires, cosmétologies... etc. Elle fait partie de système d'assurance qualité d'un laboratoire qui doit faire l'objet d'évaluer les performances de la méthode d'analyse utilisée dans des conditions analytiques bien précises et d'assurer la fiabilité et la traçabilité de ces résultats produits , par l'étude de certains paramètres (critères de validation) au moyen d'outils statistiques .En effet la validation est une étape obligatoire du cycle de vie d'une procédure analytique comme il a été défini et publié dans les différents principaux référentiels ,documents et guides (ISO , ICH , SFSTP,FDA , etc.).[8][9]

1. Définition

La validation est une opération qui intervient après le développement d'une nouvelle procédure d'analyse, elle sert à démontrer que la méthode adoptée à l'application prévue est performante et que les résultats obtenus sont fiables, et pour que cette définition soit juste elle doit répondre aux exigences des différents documents réglementaires et directives tels que ISO 8402 :1995, NF03-110-1998 USP25 2005. [10]

La validation des méthodes analytiques est une confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies. [10]

Selon ICH Q₂A : Validation d'une procédure analytique : l'objectif de la validation d'une procédure analytique est de démontrer qu'elle est appropriée à l'usage auquel elle est destinée. [10]

2. Buts

La validation analytique a pour but de rendre des résultats suffisamment fiables, garantir aux autorités compétentes ainsi qu'aux laboratoires d'analyse que chaque analyse réalisée ultérieurement une fois la procédure validée sera la plus exacte possible ; c'est-à-dire l'écart entre la valeur calculée et la vraie valeur sera inférieure aux limites d'acceptation selon la procédure. Autrement dit, l'objectif de la validation est de démontrer que la procédure en question correspond à l'usage auquel elle est destinée [8].

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

3. Quelles procédures analytiques valider ?

En ce qui concerne la validation :

Toutes les procédures analytiques doivent être validées

Selon les normes NF-EN-ISO / CEI : le laboratoire doit valider :

- Les méthodes conçues / développées par le laboratoire
- Les méthodes normalisées employées en dehors de leur domaine d'application prévu ainsi que les applications ou modifications de méthodes normalisées.

Les procédures analytiques de la Pharmacopée Européenne et de la Pharmacopée Américaine doivent être considérées comme validées

En ce qui concerne la revalidation :

L'ICH préconise une revalidation dans les cas suivants :

- Modification de la voie de synthèse de la substance pharmaceutique.
- Modification de la composition du produit fini.
- Modification de la procédure analytique.
- Modification des conditions opératoires.
- Déplacement des automates [10].

4. Aspects réglementaires

Des directives sur la validation des méthodes analytiques sont fournies dans des publications différentes, on cite :

4.1. Documents ISO 17025

C'est un modèle de fonctionnement pour les laboratoires, afin d'apporter la preuve de leur compétence technique en étalonnages et essais, d'améliorer en continu l'organisation et la qualité de ces laboratoires

4.2. Documents ISO 5705

La série ISO 5705 exprime le profil d'exactitude total, en calculant la justesse et la fidélité des résultats des méthodes de mesure.

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

4.3. Documents de la FDA

Validation of Bioanalytical Method (2001).

4.4. Documents AFNOR (normes AFNOR NF V 03-110)

Présentent les différents caractères de la validation des procédures analytiques (AFNOR 1994), le protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude et domaines d'application de la validation

4.5. Documents ICH

Deux guidelines ICH (International Conference on Harmonization) ont été dédiés à la validation analytique : Q2: «Validation analytique» :

- ICHQ₂A: Validation of analyticals method « definitions and terminology »1995:

Textes qui regroupent les définitions et la terminologie qui doivent être prises en compte au cours de la validation des méthodes analytiques.

- ICHQ₂B: Validation of analyticals method «Methodology» 1997:

Son but est de fournir des conseils et recommandations sur la manière d'appréhender les différentes caractéristiques de la validation pour chaque méthode analytique. En outre, le document fournit une indication sur les données qui devraient être présentées dans un dossier d'enregistrement.

ICHQ₂R₁: Validation of analyticals method « Text and methodology » 2005:

C'est une révision de l'ICHQ₂A et ICHQ₂B, dans le but de regrouper les textes de la terminologie et les définitions avec la méthodologie.

4.6. Documents des commissions de la SFSTP

Présentent les recommandations réglementaires communément admises et appliquées dans l'industrie pharmaceutique nationale et une démarche statistique pour la validation d'une procédure analytique. [11]

- ✓ SFSTP « Guide de validation, rapport d'une commission SFSTP »
 - Méthodologie (1992)

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

- Exemples d'application (1992)
- ✓ SFSTP « dosage dans les milieux biologiques par des méthodes chromatographiques» (1997)
- ✓ SFSTP « validation des procédures analytiques : harmonisation des démarches»
 - Partie I : généralités (2003)
 - Partie II : statistiques (2006)
 - Partie III : exemples d'application (2008)
- ✓ SFSTP (2012)

5. Critères de la validation

Les principaux critères de validation sont ceux qui sont largement reconnus et couramment utilisés dans les laboratoires d'analyse et s'articulent comme suit

Tableau III : Critères de la validation en fonction du type d'analyse

Type de tests caractéristiques	Dosage	Impuretés		Identification	Dosage bio analyse
		Qualitatif	Essais limites		
Justesse	✓	✓			✓
Fidélité répétabilité	✓	✓			✓
Fidélité fidélité intermédiaire	✓	✓			✓
Spécificité Sélectivité	✓	✓	✓	✓	✓
Limite de détection		✓	✓		✓
Limite de quantification		✓			✓
Linéarité	✓	✓			Fonction de réponse
Robustesse	✓	✓	✓		✓

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

5.1. Spécificité (sélectivité)

La spécificité d'une méthode analytique est sa capacité à établir de manière univoque l'existence, l'identification de la substance à analyser en présence d'autres composants susceptibles de l'accompagner (impuretés, interférences...).

Selon cette définition, il s'agit de démontrer que la ou les substance(s) analysée(s) au sein de la matrice est bien le ou les analyte(s) recherché(s).[8],[12]

5.2. Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)

La fonction de réponse d'une méthode analytique exprime la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration (quantité) en substance à examiner à l'intérieur de l'intervalle de dosage. La courbe d'étalonnage traduit une fonction de réponse monotone la plus simple.

Cette relation est exprimée par une fonction f qui doit être monotone (strictement croissante ou décroissante). [8]

5.3. Linéarité

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage à fournir des résultats directement proportionnels à la quantité ou à la concentration d'analyte dans l'échantillon. [Concentration calculé = fonction (concentration introduite)].[8],[12]

5.4. Fidélité

Ce critère veut dire l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures répétées et effectuées sur un même échantillon homogène et dans des conditions constantes et déterminées, il faut tenir compte qu'elle n'est pas en rapport avec la valeur vraie ou spécifiée, elle traduit seulement la distribution des erreurs aléatoires, elle s'évalue à trois niveaux : la répétabilité, fidélité intermédiaire (intra laboratoire), et la reproductibilité (inter laboratoire); la définition de ces dernières est donnée ci-dessous :

- Répétabilité : c'est-à-dire que les résultats d'essais indépendants sont obtenus dans des conditions de répétabilité : qui veut dire : la même

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

méthode, sur des échantillons d'essais identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et ceci pendant un court intervalle de temps. [8]

- Fidélité intermédiaire : les résultats d'essais indépendants sont obtenus dans des conditions bien particulières, c'est-à-dire : la même méthode, sur des échantillons d'essais identiques, dans le même laboratoire, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents et ceci pendant un intervalle de temps donné. [8]
- Reproductibilité : veut dire que les résultats d'essais sont obtenus dans des conditions de reproductibilité : la même méthode, des échantillons d'essais identiques mais dans différents laboratoires avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents. [8]

5.5. Justesse

Autrefois appelée exactitude ou exactitude de la moyenne (mais cet usage n'est plus recommandé) a pour définition selon ISO 5725, 1996 : l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir de larges séries de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée, sa mesure est exprimée en termes de biais (relatifs, absolus) et recouvrements.

5.6. Exactitude

Exprime la somme de la justesse et fidélité, sa définition selon ISO5725 ,1996 correspond à la suivante : étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée communément appelée valeur conventionnellement vraie, et donc cette étroitesse d'accord signifie la somme d'erreurs systématiques et aléatoires combinée qui est la résultante de l'erreur totale. [8]

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

5.7. Limite de détection (LD)

C'est la plus petite quantité d'analyte pouvant être détectée dans un échantillon au cours d'une procédure d'analyse mais ne pouvant pas être quantifiée dans les conditions expérimentales décrites dans la procédure. [8],[13].

5.8. Limite de quantification (LQ)

C'est la plus petite quantité d'analyte pouvant être dosée dans un échantillon au cours d'une procédure d'analyse avec une exactitude définie dans les conditions expérimentales décrites dans la procédure. [8]

5.9. Intervalle de dosage

Il définit les valeurs incluses entre les niveaux supérieurs et inférieurs pour lesquelles a été démontré que l'exactitude et la linéarité sont respectées dans la procédure selon la méthode utilisée.[8]

5.10. Sensibilité

C'est le rapport de la variation de la réponse de la méthode d'analyse à la variation de la quantité ou la concentration d'analyte. C'est-à-dire on parle de sensibilité si une faible quantité ou concentration d'analyte entraîne une variation significative de la réponse. [8]

5.11. Robustesse

C'est la capacité d'une méthode d'analyse à rendre des résultats exacts en présence de faibles changements de conditions expérimentales capable de se produire dans l'utilisation de cette procédure c'est-à-dire que cette méthode supporte ces changements, elle a pour but de définir les variations de chacun des paramètres opératoires qui peuvent modifier le résultat de l'analyse et de donner une idée sur la fiabilité de la méthode d'analyse. [12].

6. Choix des critères de la validation

Il existe divers critères de validation dont le choix dépend de la méthode d'analyse, qu'elle soit qualitative ou quantitative ; ces derniers ne sont obligatoirement pas décrits en

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

totalité pour chaque méthode mais également l'absence de l'un d'eux doit être justifiée et témoinnée dans le rapport de caractérisation et de validation d'une méthode d'analyse [13].

Selon l'étape du processus de validation, ces critères sont classés en deux caractérisations :

- Caractérisation intra laboratoire : on a la spécificité, la sensibilité, la fidélité, la limite de détection et domaines de validité qui font partie des critères de performances qualitatives et quantitatives, tandis que la fonction d'étalonnage, la justesse, l'exactitude, linéarité et limite de quantification qui font partie des critères de performance quantitatives seulement.
- Caractérisation inter laboratoire : on a la reproductibilité, répétabilité ainsi que d'autres critères tels que le délai, la rapidité, le coût ... qui sont considérés comme étant critères de performance qualitatives et quantitatives, comme on a aussi la limite de détection, la spécificité, la sensibilité qui sont qualitatives uniquement et la limite de détection qui est quantitative.

Il faut noter qu'on peut avoir d'autres critères selon les exigences des référentiels.

7. Protocole de la validation

Lors de la phase de validation, tous les résultats obtenus doivent être rapportés, à la fin de cette phase et avant son exploitation en routine, la procédure analytique doit complètement être décrite sous-forme d'un mode opératoire standardisé.

En accord avec les guides référentiels, les principaux objectifs de la phase de validation sont :

- Démontrer la spécificité ou la sélectivité
- Valider la fonction réponse ou modèle d'étalonnage utilisé en routine
- Estimer la fidélité
- Estimer la justesse
- Estimer l'exactitude
- Valider les seuils de quantification
- Valider l'intervalle de dosage
- Vérifier la linéarité de la procédure analytique

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

L'exactitude s'applique aux méthodes développées et mises au point ainsi la sélectivité ou spécificité, une fois cette dernière est étudiée on opère deux ensembles d'échantillons :

- Standard d'étalonnage (SE) : peuvent être réalisés sans la matrice (si on a démontré l'absence d'effet matrice) ou avec la matrice, utilisée pour évaluer les différentes fonctions de réponses $y=f(x)$ afin d'effectuer les prédictions inverses.
- Standard de validation (SV) : doivent toujours être réalisés avec la matrice, utilisé dans le but de déterminer l'erreur totale à chaque niveau de concentration, calculer l'intervalle de tolérance et tracer le profil d'exactitude et déterminer les limites inférieure et supérieure de quantification (intervalle de dosage).
- En ce qui concerne la préparation des SE et SV, celle-ci dépend du protocole de validation choisi. Le logigramme de la figure suivante présente la démarche proposée dans le guide SFSTP 2003 pour sélectionner un protocole expérimental de la validation en fonction des contraintes ou des spécificités liées à la procédure de dosage sous épreuve.

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

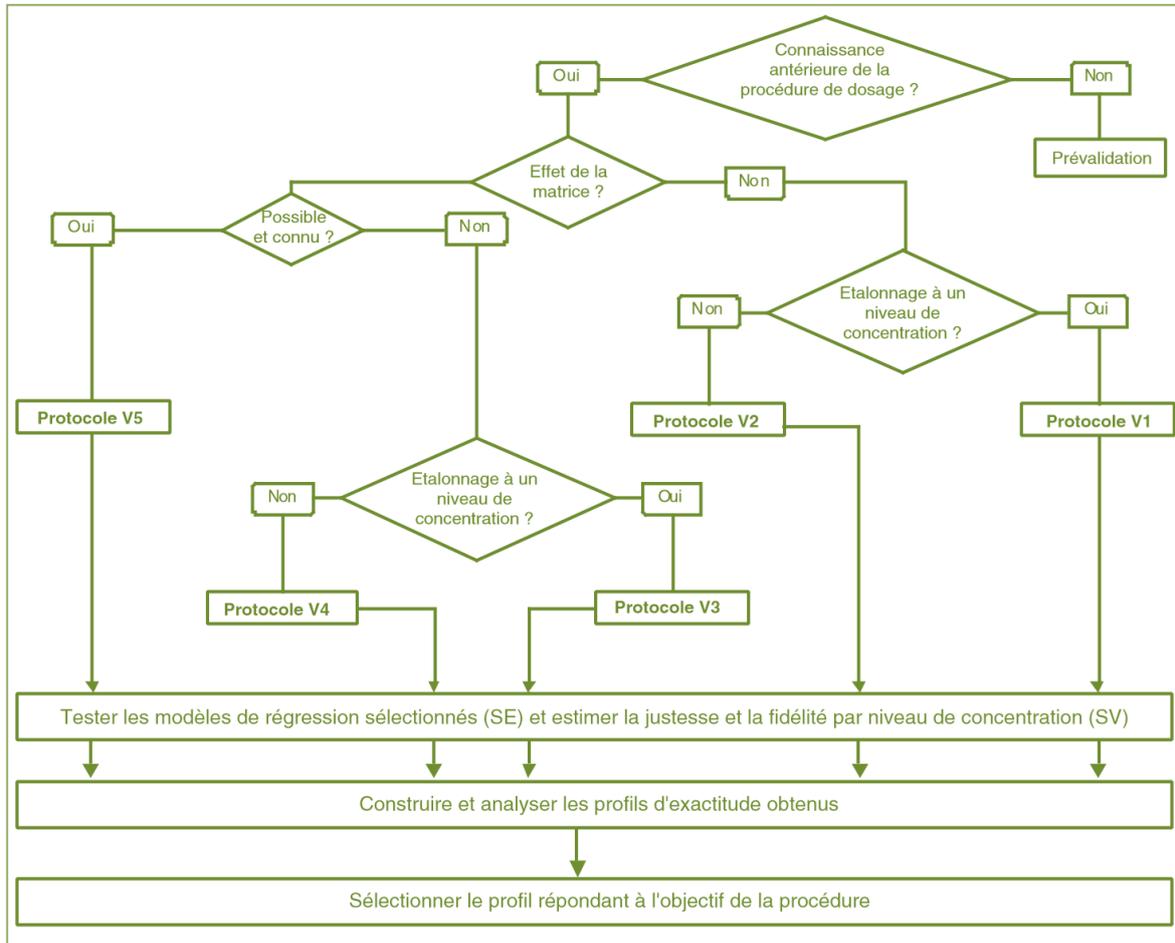


Figure 03 : logigramme permettant de sélectionner un protocole de validation [8]

Le tableau suivant présente selon le protocole choisi, le nombre total d'essai à réaliser pour valider la procédure analytique concernée.

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

Tableau IV : Choix du nombre de standards d'étalonnage et de validation en fonction du protocole choisi. [8]

Standards	Niv de conc	Protocole				
		V1	V2	V3	V4	V5
SE. Etalonnage sans la matrice	Bas		2		2	
	Médian	2	2 ⁽²⁾	2	2 ⁽²⁾	
	Haut	2 ⁽¹⁾	2	2 ⁽¹⁾	2	
SE. Etalonnage avec la matrice	Bas				2	2
	Médian			2	2 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾
	Haut			2 ⁽²⁾	2	2
	Addit					2 ⁽³⁾
SV. Validation avec la matrice	Bas	3	3	3	3	3
	Médian	3	3	3	3	3
	Haut	3	3	3	3	3
Nbre minimum séries		3	3	3	3	3
Nbre total essais (min)		33	45	39	63	45

8. Etude statistique

8.1. Spécificité

Pour vérifier la spécificité d'une méthode d'analyse, on doit en premier lieu , préparer une solution placebo dont son signal doit être obligatoirement nul ($S_0=0$) afin d'assurer que la solution en question ne présente pas d'interférence(s). En second lieu , on prépare deux solutions ; une solution standard et solution de la forme reconstitué . On parle d'absence d'effet matrice si le signal obtenu de la première solution (S_1) est comparable à celui de la deuxième solution (S_2), c'est-à-dire que les deux chromatogrammes obtenus renferment des pics en même temps de rétention et avec des surfaces comparables, ou des droites comparables. Cette comparaison est basée sur le test t de Student. [8].

8.2. Fonction de réponse

Il existe une relation entre la réponse Y après des mesures réalisées sur une série des SE et la concentration X de ces solutions, qui est exprimée par une fonction de type :

$$Y = F(X) + \varepsilon$$

Avec ε qui est l'erreur résiduelle qui doit être le minimal possible.

Cette fonction doit être strictement monotone sur un intervalle de dosage donné.

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

Selon la méthode utilisée, on a différentes fonctions de réponses qui peuvent envisagées lors de la validation. Le tableau V résume quelques exemples de ces fonctions [14]

Tableau V : Exemples de fonctions de réponses [14]

Type	Equation	Paramètres	Linéarité
Droite passant par l'origine	$Y = \beta X$	β	Oui
Droite	$Y = \alpha + \beta X$	β, α	Oui
Fonction quadratique	$Y = \alpha + \beta X + \gamma X^2$	β, α, γ	Oui
Fonction logistique à 4 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{1 + (\frac{X}{\gamma})^\beta}$	$\beta, \alpha, \gamma, \sigma$	Non
Fonction logistique à 5 paramètres	$Y = \alpha + \frac{\delta - \alpha}{[1 + (\frac{X}{\gamma})]^\psi}$	$\beta, \alpha, \gamma, \sigma, \psi$	Non

8.3. Alignement des observations

Si, pour un niveau de concentration, les quantités introduites ne sont pas identiques pour toutes les séries (souvent pour de raisons de pesées qui doivent être indépendantes), il est indispensable de procéder à un alignement sur la concentration moyenne dès lors qu'un calcul de variance doit être effectué (estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire).

Cela consiste à transformer les réponses observées ($Y_{ijk} \rightarrow Y_{ijk,c}$) afin de les aligner sur cette concentration moyenne. Cet alignement s'effectue par interpolation en ajoutant à la réponse observée la différence entre la valeur de β cette fonction à la concentration introduite.

En validation, l'alignement s'applique aux réponses obtenues avec les échantillons de validation en utilisant les équations ou fonctions de réponses obtenues avec les standards de d'étalonnage. Ainsi l'alignement des n_{ij} répétitions du niveau de concentration j de la série i s'effectue comme suit [14] :

$$Y_{ijk,c} = Y_{ijk} + f(\bar{X}_{ij}) - f(X_{ijk})$$

En résumé les règles d'alignement pour les différentes fonctions de réponses dans le tableau VI ce dessous

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

Tableau VI: Règles d'alignement pour différentes fonctions de réponses [14]

Fonction de réponse	Règle d'alignement
Droite passant ou non par l'origine	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_j - x_{ijk}]$
Fonction quadratique	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + \hat{\beta}_i [\bar{x}_j - x_{ijk}] + \hat{\gamma}_i [\bar{x}_{ij}^2 - x_{ijk}^2]$
Logistique à 4 paramètres	$y_{ijk,c} = y_{ijk} + (\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i) \left[\frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{\bar{x}_{ij}}\right)^{\hat{\beta}_i}} - \frac{1}{1 + \left(\frac{\hat{\gamma}_i}{x_{ijk}}\right)^{\hat{\beta}_i}} \right]$

8.4. Prédiction inverses

C'est une forme de fonction inverse du courbe d'étalonnage qui nous permet de déterminer les concentrations calculées, à partir des résultats de la validation, selon cette formule :

$$X_{\text{calc}} = f^{-1}(Y).$$

Avant d'appliquer cette fonction, il faut d'abord assurer l'alignement de toutes les concentrations. Le tableau VII illustre ces prédictions selon l'alignement des fonctions de réponses utilisées [1]

Tableau VII : Calcul des prédictions inverses pour différentes fonctions de réponses. [14]

Fonction de réponse	Concentration calculée
Droite passant par l'origine	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk}}{\hat{\beta}_i}$
Droite	$x_{ijk,calc} = \frac{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i}{\hat{\beta}_i}$
Fonction quadratique	$x_{ijk,calc} = \frac{-\hat{\beta}_i + \sqrt{\hat{\beta}_i^2 - 4\hat{\gamma}_i(\hat{\alpha}_i - y_{ijk})}}{2\hat{\gamma}_i}$
Logistique à 4 paramètres	$x_{ijk,calc} = \hat{\gamma}_i \left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} - 1 \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$
Logistique à 5 paramètres	$x_{ijk} = \hat{\gamma}_i \left[\left(\frac{\hat{\delta}_i - \hat{\alpha}_i}{y_{ijk} - \hat{\alpha}_i} \right)^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}} - 1 \right]^{\frac{1}{\hat{\beta}_i}}$

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

8.5. Linéarité

Pour étudier la linéarité, elle doit être valide dans l'intervalle de conformité et d'inconformité, pour cela on réalise trois séries de gammes d'étalons, pour la forme standard et pour la forme reconstituée, les droites obtenues à partir de ces dernières doivent être superposables selon la formule suivante : $Y=f(X)$

Pour qu'il y ait de proportionnalité il faut que les deux pentes soient statistiquement différentes de zéro [14],[15].

Le critère de linéarité se réfère à la relation entre la quantité introduite et la quantité calculée (résultat) d'analyte à partir de la courbe d'étalonnage tandis que la fonction de réponse se réfère à la relation entre la réponse instrumentale et la concentration [16].

8.6. Justesse et fidélité

8.6.1. Modèle de calcul

Pour déterminer ces deux paramètres, on doit d'abord calculer l'estimation. L'estimation de ces deux paramètres se réalise avec les concentrations calculées provenant des standards de validation en phase de validation (ou des standards d'étalonnage en phase de pré-validation [14].

$$X_{ijk} = \mu_j + \alpha_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Où : X_{ijk} est la K-ième concentration calculée du niveau j de la i^{ème} série.

μ_j est la moyenne des concentrations calculées de niveau j.

α_{ij} est l'écart entre la moyenne de la i^{ème} série et la moyenne μ_j , au niveau j; α_{ij} est considéré comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{B,j}^2$

ε_{ijk} est l'erreur expérimentale, considérée comme une variable aléatoire ayant une distribution normale de moyenne 0 et de variance $\sigma_{r,j}^2$

L'erreur expérimentale est supposée indépendante de la série.

Les variances $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{r,j}^2$ représentent les variances inter-série et intra-série, respectivement.

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

La méthode du maximum de vraisemblance restreint est utilisée pour estimer à chaque niveau de concentration j les paramètres μ_j , $\sigma_{B,j}^2$ et $\sigma_{r,j}^2$ du modèle. Ceci est résumé dans la Figure 03 où les deux courbes de linéarité et de fonction de réponse sont présentées :

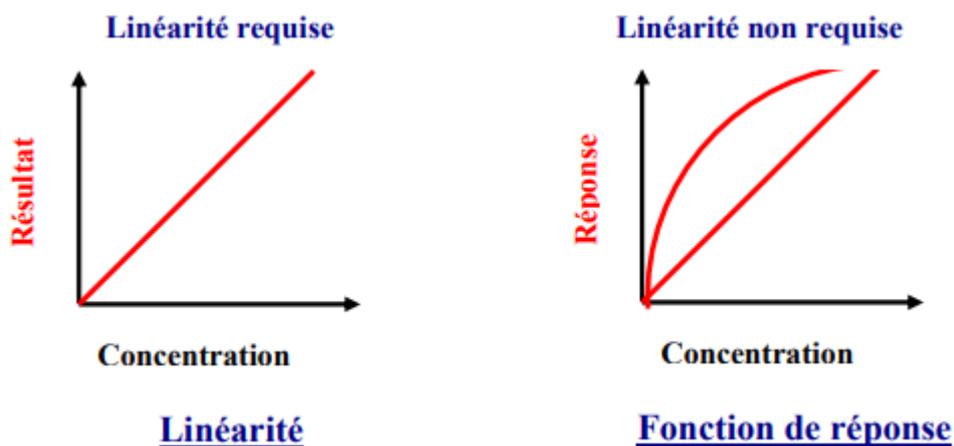


Figure 04 : La différence entre linéarité et fonction de réponse [17]

8.6.2. Justesse

La justesse (ou le biais) de la méthode se mesure, à un niveau donné de concentration est obtenue en calculant la différence entre la moyenne arithmétique des concentrations introduites et la moyenne des concentrations calculées. Le biais peut s'exprimer en termes absolu, relatif ou de recouvrement par rapport aux quantités introduites, comme suit [14]:

$$\text{Biais}_j = \hat{\mu}_j - \hat{X}_j$$

$$\text{Biais}(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j - \hat{X}_j}{\hat{\mu}_j} \times 100$$

$$\text{Recouvrement}(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j}{\hat{X}_j} \times 100$$

Avec :

\hat{X}_j = moyenne des concentrations introduites.

$\hat{\mu}_j$ = moyenne des concentrations prédites.

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

8.6.3. Fidélité

L'estimation de la variance intra-série donne une estimation de la variance de répétabilité tandis que la somme des estimations des variances intra- et inter série donne une estimation de la variance de fidélité intermédiaire. [14].

Variance de la fidélité intermédiaire :

$$\hat{\sigma}_{IP,j} = \sqrt{\hat{\sigma}_{w,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2}$$

L'écart type de la répétabilité :

$$\hat{\sigma}_{B,j}^2 = \hat{\sigma}_{w,j}^2$$

8.7. Exactitude

L'exactitude d'un résultat (par opposition à celui de la méthode analytique) exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée, aussi appelée valeur conventionnellement vraie, à savoir pour chaque mesure

On peut l'exprimer en valeur relative : L'exactitude des résultats, l'erreur maximale observée, nous donne des indications sur les résultats obtenus dans les expériences de validation et un impact sur le choix de la fonction de réponse [14]

$$\text{Exactitude} = X - \mu$$

$$\text{Exactitude}(\%) = \frac{X - \mu}{\mu} \times 100$$

8.8. Erreur totale et profil d'erreur totale

Pour mesure d'une méthode analytique reflète, sa vraie valeur, biais, et fidélité, ce qui exprime comme suit :

$$\begin{aligned} X &= \mu + |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}} \\ X - \mu &= |\text{Biais}|_{\text{procédure}} + \text{Fidélité Intermédiaire}_{\text{procédure}} \\ X - \mu &= \text{Erreur total} = \text{Erreur de mesure} \end{aligned}$$

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

D'après ces relations, l'erreur totale, est la somme de la justesse (biais) et de la fidélité. On plus, l'erreur totale est un bon indicateur de l'exactitude des résultats d'une méthode d'analyse. [14][17]

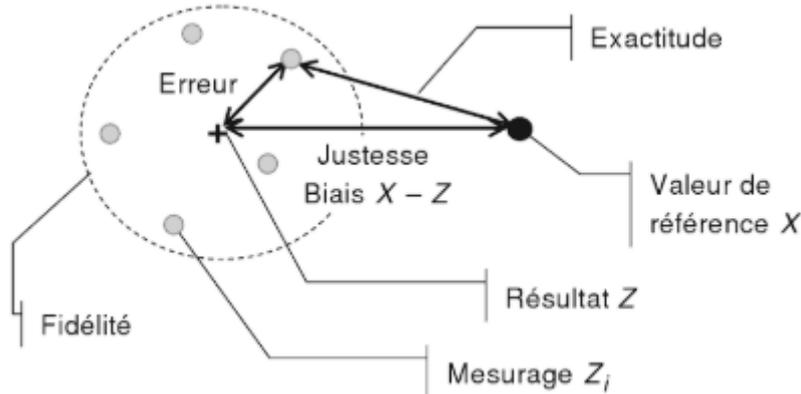


Figure 05 : représentation schématique de l'exactitude [9].

8.8.1. Calcul de l'intervalle de tolérance

Ce qui nous importe cependant en validation, ce n'est pas la validité des résultats obtenus que nous obtenions avec l'erreur totale, mais plutôt la garantie ou une représentation de ce que la même procédure analytique pourra donner comme résultats dans le futur, C'est le rôle de l'intervalle de tolérance.

L'estimation des paramètres μ_j , $\hat{\sigma}_{B,j}$ et $\hat{\sigma}_{r,j}$ à chaque niveau de concentration j a pour but de permettre d'estimer la proportion attendue d'observation dans les limites d'acceptation prédéfinies $[-\lambda, \lambda]$, c'est-à-dire :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ [|X - \mu_T| < \lambda] | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M \} \geq \beta$$

L'intervalle de tolérance sera calculé pour chaque niveau de concentration envisagé avec les standards de validation. Pratiquement, l'intervalle de tolérance se calcule comme suit en valeur absolue :

$$E_{\hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M} \{ P_x [\hat{\mu}_M - Q_t \hat{\sigma}_M < X < \hat{\mu}_M + Q_t \hat{\sigma}_M | \hat{\mu}_M, \hat{\sigma}_M] \} = \beta$$

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

$$\begin{aligned} \hat{\sigma}_{FI,j}^2 &= \hat{\sigma}_{r,j}^2 + \hat{\sigma}_{B,j}^2 \\ R_j &= \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{r,j}^2} \\ B_j &= \sqrt{\frac{R_j+1}{nR_j+1}} \\ v &= \frac{(R+1)^2}{\frac{(\frac{R+1}{K})^2}{I-1} + \frac{1-\frac{1}{K}}{I \times K}} \end{aligned}$$

Où :

$Q_t(v; \frac{1+\beta}{2})$ est le quantile β de la distribution t de Student à v degrés de liberté.

Le même intervalle en échelle relative devient

$$\left[\text{biais}(\%) - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}}; \text{biais}(\%) + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}} \right]$$

Deux termes sont contenus dans l'intervalle de tolérance : l'un étant la justesse et l'autre étant, à un facteur près, le coefficient de variation de fidélité intermédiaire. C'est la raison pour laquelle cet intervalle peut ainsi être considéré comme une expression de l'exactitude des résultats. Mais l'intervalle de tolérance intègre une dimension supplémentaire, celle de chance (ou risque) pour des résultats futurs, conditionnellement à des résultats passés. La méthode peut dès lors être considérée comme exacte au niveau de chance β pour le niveau de concentration en question, si l'intervalle de tolérance est incluse dans les limites $[-\lambda, \lambda]$ définies a priori en fonction des objectifs de la méthode. [14]

8.8.2. Le profil d'exactitude

Selon l'équation ci-dessous les bornes de ces intervalles sont :

$$L_j(\text{borne supérieure}) = \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2} CV_{FI,j}}$$

CHAPITRE II : VALIDATION ANALYTIQUE

$$U_j(\text{borne inférieure}) = \text{bisais}(\%)_j + Q_t \left(v; \frac{1+\beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{pnB_j^2}} CV_{FI,J}$$

Le profil d'exactitude de la méthode s'obtient en reliant d'une part les bornes L_j entre elles ($L_1 \dots L_m$) et d'autre part les bornes U_j entre elles ($U_1 \dots U_m$). [14].

Chapitre III

CHAPITRE III : COMPRIMÉS

1. Définition du comprimé

Selon la pharmacopée européenne les comprimés sont des préparations de consistance solide contenant une unité de prise d'un ou plusieurs principes actifs. Ils sont obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules. Ils sont destinés à la voie orale. Certains sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagrégés dans l'eau avant administration. Certains, enfin doivent séjourner dans la cavité buccale pour y libérer le principe actif. Plusieurs catégories peuvent être distinguées. [1]

2 . Différents aspects des comprimés

Les comprimés peuvent être classés en deux catégories selon le type de libération

- Comprimés à libération conventionnelle ;
- Comprimés à libération modifiée.

2.1 Comprimés à libération conventionnelle (immédiate)

Ce sont des formes pour lesquelles la libération du principe actif n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultant de la mise en œuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. [18]

2.1.1 Comprimés nus ou non enrobés

Ils comprennent des comprimés à couche unique et des comprimés à couches multiples disposées parallèlement ou concentriquement. Les premiers résultent d'une seule compression, les autres de compressions successives. Ils peuvent avoir des formes très diverses

2.1.2 Comprimés enrobés

Ce sont des comprimés dont la surface est recouverte d'une ou plusieurs couches de mélanges de substances diverses comme les résines, les gommes, la gélatine, les sucres, les cires, les polyols et les colorants. [19]

Quand l'enrobage est constitué d'un film polymère très mince, le comprimé est dit pelliculé.

- Un comprimé dragéifié, quant à lui, est enrobé avec du sucre. [18]

CHAPITRE III : COMPRIMES

2.2 Comprimés à libération modifiée

Ce sont des comprimés, enrobés ou non, qui sont préparés avec des excipients spéciaux ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de libération de la (ou des) substance(s) active(s). [18]

2.2.1 Comprimés à libération prolongée

Il s'agit de préparations dont la vitesse de libération de la substance active est inférieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie. La dose de principe actif total y'est toujours plus élevée que dans une forme à libération conventionnelle.

La vitesse de libération plus lente a pour but d'obtenir une concentration en principe actif la plus constante possible dans l'organisme tout en diminuant le nombre d'administration. [18]

2.2.2 Comprimés à libération retardée

Les comprimés à libération retardée sont des formes galéniques où le principe actif est libéré à un moment ou un lieu différent par rapport à la forme conventionnelle administrée par la même voie. Le cas notamment des comprimés gastro-résistants. [18]

2.2.3 Comprimés à libération accélérée

Ce sont des préparations dont la vitesse de libération de la substance active est plus rapide que celle de la forme à libération conventionnelle destinée à la même voie d'administration.

Elles sont généralement administrées après mise en solution. On trouve :

- Les comprimés dispersibles ;
- Les comprimés solubles ;
- Les comprimés effervescents ;
- Les comprimés orodispersibles ;
- Les lyophilisats oraux [18]

CHAPITRE III : COMPRIMÉS

2.2.4 Comprimés à utiliser dans la cavité buccale

Ce sont le plus souvent des comprimés non enrobés. Leur formule est établie de façon à permettre une libération lente et une action locale de la ou des substances actives, ou la libération et l'absorption de la (ou des) substance(s) active(s) dans une partie définie de la cavité buccale. [18]

3. Caractéristiques organoleptiques des comprimés

Le comprimé doit être identifiable afin d'éviter toute confusion chez les patients mais également le personnel soignant. Le risque iatrogène est augmenté en cas de polymédication et ou déconditionnement des médicaments. Chaque comprimé est caractérisé visuellement par sa forme, ses dimensions, sa couleur et son marquage. [20]

3.1 Formes et dimensions

Un comprimé correspond en général à « un cylindre droit dont les faces inférieures et supérieures peuvent être plates ou convexes et les bords biseautés ». En effet, lors de la production de comprimés par compression, la matrice et les poinçons définissent la forme du comprimé. Il faut souligner que la forme du comprimé n'est pas une caractéristique anodine : Certaines géométries sont facilement érodées et peuvent être difficilement enrobées.

A noter que la surface externe du comprimé peut avoir une influence sur la libération du principe actif selon les recommandations de la FDA relatives aux attributs physiques des comprimés et capsules génériques, les comprimés ronds doivent être privilégiés par rapport aux comprimés plats dont le risque d'adhérence aux parois de l'œsophage est favorisé par sa grande surface.

Il est également souligné que plus le comprimé est petit, plus son administration est aisée : Passage rapide à travers le pharynx et l'œsophage. Le diamètre recommandé n'excède pas 22 mm et est préférentiellement inférieure à 17 mm.[20]

3.2 Couleurs et marquage

La couleur du comprimé correspond à celle du mélange de matières premières ou à la coloration de l'enrobage. La réglementation relative à l'emploi de colorant diffère selon les pays, et l'ajout d'un colorant peut donc restreindre la commercialisation du comprimé à un territoire.

CHAPITRE III : COMPRIMES

La coloration joue un rôle esthétique et constitue un critère d'identification discriminant dans le cadre de l'identification du comprimé pour preuve, le guide visuel d'identification des médicaments classe les médicaments photographiés par couleur.

Enfin, l'altération du médicament peut se traduire par un changement de couleur.

Le marquage des comprimés peut se faire à l'aide de motifs en relief, de gravures, ou des impressions. Les comprimés sécables présentent une ou plusieurs barres de cassure assurant la division des comprimés en fractions uniformes.[20]

3.3 Structure

En fonction des contraintes de formulation et du profil de libération souhaité, les comprimés peuvent présenter des structures variées, un comprimé peut être nu ou enrobé. A noter que si l'enrobage est très mince (tel un film ou pellicule), on parle de comprimé pelliculé.

La couverture en sucre est spécifique des comprimés dragéifiés. L'enrobage a pour but de masquer le goût ou l'odeur désagréable, protéger le principe actif (de la lumière, des agents atmosphériques, ...), contrôler la libération du principe actif, améliorer l'esthétique du comprimé et/ou faciliter l'identification (coloration).[20]

4. Composition des comprimés

4.1 Principes actifs

La substance active, ou le principe actif d'un médicament désigne chacun des composants de ce médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. Cela peut être une substance pure chimiquement définie (plus ou moins abusivement qualifiée de « molécule ») ou un mélange de plusieurs substances chimiquement proches (isomères, par exemple) ou encore une substance définie par son mode d'obtention. Il est utilisé en vue de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmaceutique, immunologique ou métabolique. [21]

CHAPITRE III : COMPRIMES

4.2 Principaux excipients

Selon la nature des Excipients et pourcentages moyens :

- **Diluant(s)** environ 20-90%, ce sont des excipients de charge : lactose, phosphate calcique, carbonate de calcium, sorbitol, mannitol ;
- **Liant(s)** environ 5-10%, on recherche les propriétés anti adhérente (ne colle pas aux parois de la machine), anti friction (évite forces de frottement et grippage) et antistatique (contre l'électricité statique) : gomme, gélatine, amidon, stéarate de magnésium, talc...
- **Lubrifiant** (glident) : facilitent l'écoulement dans la trémie. Environ 0,5 -1 %
Silice colloïdale ;
- **Désagrégeant(s)** ou **délitant(s)** environ 5-10%, amidon de maïs, de blé de riz ;
carboxyméthyl d'amidon, carboxyméthylcellulose (CMC), polyvidone (PVP) ;
- **Colorants** ;
- **Aromatisants**, masqueurs d'amertume.[22]

5. Fabrication des comprimés

La fabrication des comprimés nécessite la réalisation de plusieurs étapes appelées opérations unitaires, qui sont :

- Le mélange des poudres de matières premières
- La granulation
- La compression qui peut être suivie ou non d'une étape d'enrobage [23]

6. Contrôles effectués

6.1. Uniformité de masse

Cet essai présente un intérêt dans la mesure où il permet indirectement de s'assurer du dosage en substances actives. En effet, si la masse est constante et si le mélange de départ est homogène, on peut être sûrs qu'on a partout la même quantité de PA

6.2. Uniformité de teneur

Elle se fait sur 10 comprimés et sur chaque comprimé on va doser la substance active. On exige cet essai chaque fois qu'on a une faible teneur en PA (qualité inférieur à 2% qui sont donc généralement des médicaments à marge thérapeutique étroite)

CHAPITRE III : COMPRIMES

6.3. Désagrégation

L'essai se fait sur 6 unités systématiquement quel que soit le type d'appareillage. Les conditions opératoires varient, également en fonction du type de comprimé et l'interprétation des résultats aussi. Mais dans tous les cas, on vérifie que le comprimé se désagrège en un temps bien déterminé. Il y'a un temps à ne surtout pas dépasser.

6.4. Résistance à la rupture (dureté)

On évalue la force maximale qu'ils pourront subir avant de se rompre (avant d'être écrasés). L'essai consiste à mettre le comprimé dans une position verticale (ou radiale c'est-à-dire que c'est sa surface plane qui va subir le choc) et donc sur l'épaisseur la plus faible. On augmente progressivement la valeur de la force jusqu'à rupture du comprimé.

6.5. Fiabilité

C'est le fait que le comprimé perd une partie de sa masse en poudre suite à différentes opérations tel que le conditionnement, transport, stockage.

6.6. Essai de dissolution

C'est un essai très important en matière de biopharmacie. Il consiste à vérifier la quantité de PA qui est passée en solution en un temps bien déterminé. Pour les formes classiques, on dit généralement qu'il faut que 80% du PA soit passé en solution durant 30 minutes. [24]

CHAPITRE III : COMPRIMÉS

7. Avantages et inconvénients

Tableau VIII : Avantages et inconvénients des comprimés. [25]

Les comprimés	
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">- Emploi facile : solidité suffisante pour le transport et le conditionnement, faciles à avaler- Dosage précis- Forme sèche : bonne conservation- Prix de revient bas car fabrication industrielle à grande échelle- Possibilité de masquer complètement la saveur par l'enrobage- Possibilité de contrôler la libération du principe actif	<ul style="list-style-type: none">- Si le délitement n'est pas rapidement assuré, il y'a un risque pour la muqueuse digestive- La mise au point est délicate- Pas de principe actif liquide- Nécessité d'utiliser de nombreux excipients qui peuvent présenter des effets secondaires (EEN).

8. Les comprimés de furosémide

Le furosémide sous le nom déposé « Furosal » se présente sous forme de petits comprimés, sécables (avec une rainure au milieu), de forme ronde, de couleur blanche, conditionnés en 20 comprimés par boîte.

PARTIE PRATIQUE

Matériel & méthodes

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel

1.1.1 Matières premières

Tableau IX : Matières premières utilisées

Matières premières	Fournisseur
Furosémide	Substance de référence fourni gracieusement par le LNCPP
Placebo	Préparé au laboratoire de chimie analytique

1.1.2 Réactifs

Tableau X : Réactifs utilisés

Réactifs	Fournisseurs
Hydroxyde de sodium NaOH	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Acétonitrile	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Acide phosphorique	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Na₂HPO₄	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
NaH₂PO₄	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou
Eau distillée	Fourni gracieusement par le laboratoire de Chimie Analytique de Tizi Ouzou

1.1.3 Appareillages et équipements

Les appareils et équipements utilisés afin de réaliser ce travail sont résumés si dessous :

MATERIEL ET METHODES

Tableau XI : Appareillages utilisés

Désignation	Spécification	Usage
HPLC (SHIMDZU LC20)	Pompe	Lc20 at
	Injecteur Automatique	SIL 20 A
	Contrôleur	CBM-20
	Compartiment de la colonne	CTO-20 A
	Colonne	C18 (15 cm)
	Détecteur	Spectrophotomètre UV visible
	Logiciel D'exploitation	LC-solution
	Dégazeur	
Distillateur	Lab-Tech	Eau distillée
Pompe à vide	Fisher BioblockScientific $P_{max} = 4$ bar	Filtration de la phase mobile
Sonicateur	Advantage-LAB	Solubilisation
Agitateurs magnétiques	NAHITA ModeL690-1	Homogénéisation des Solutions
Balances analytiques	KEREN	Pesé
	METLER TOLEDO	
PH-mètre	METLER TOLEDO	Préparation des tampons
Etuve	MEMMERT	Séchage
Osmoseur	DiaSys Mini OP 100	Purificateur

1.1.4 Verreries et autres

La verrerie utilisée est résumée dans le tableau suivant :

MATERIEL ET METHODES

Tableau XII : Verreries et autres matériels utilisés

Verreries	Autres
Fioles jaugées 50ml, 100ml, 200ml, 1000ml, 2000ml	Micropipette :1ml
Béchers	Poires
Eprouvette :1000ml	Pissettes
Pipettes graduées : 20ml	Spatules
Pipettes jaugées : 5ml	Papier aluminium
Entonnoirs	Des flacons pour phase mobile
Vials	Bavettes
	Barreau magnétique
	Mortier
	Tamis
	Pulvérisateur
	Coupe-comprimés

1.2 Méthode

Afin d'optimiser notre méthode de dosage du furosémide 40mg par HPLC, nous nous sommes référés à la pharmacopée européenne dans sa partie monographie du furosémide, où ils ont décrit le dosage des substances apparentées par HPLC, où ils ont proposé d'utiliser l'hydroxyde d'ammonium comme phase mobile. Vu la toxicité énorme de cette dernière, nous avons préféré utiliser un mélange d'acétonitrile et tampon phosphaté. Préparant des tampons à différents PH, pour choisir un PH optimum de 5.01. Également, nous avons essayé différentes proportions de phase organique (acétonitrile) et tampon. A la fin, nous avons opté pour une proportion de 35/65 v/v. Comme nous avons choisi un débit à 1ml/min après plusieurs essais. Quant au temps d'analyse, il est de 7min car le temps de rétention est obtenu à 4.85min. Nous avons aussi fixé la longueur d'onde à 277nm après avoir effectué un balayage par spectromètre d'absorption UV Visible, confirmant que le furosémide absorbe à cette longueur d'onde et autres (223nm et 318nm).

1.2.1 Méthodologie de la validation

Il existe de nombreux documents officiels décrivant les critères de la validation à tester, mais ne proposent pas de protocole expérimental et se limitent le plus souvent aux concepts généraux. C'est pourquoi deux commissions SFSTP ont élaboré successivement des guides de validation (en 1992 pour les analyses des spécialités pharmaceutiques et en 1997 pour les analyses en milieu biologique) dans le but d'aider concrètement les industriels du médicament à appliquer les recommandations réglementaires. Si ces premiers guides ont

MATERIEL ET METHODES

largement contribué à faire appliquer et progresser les validations analytiques, ils présentent toutefois des faiblesses quant aux conclusions des tests réalisés et quant à l'aide à la prise de décision au regard de limites d'acceptation définies pour l'usage d'une procédure analytique. Sur ce, le présent travail est basé sur les recommandations de la commission SFSTP publiées en 2003 complétées en 2006 qui propose de revoir les bases mêmes de la validation analytique pour une démarche harmonisée, en distinguant notamment les règles de diagnostic et les règles de décision. Ces dernières reposent sur l'utilisation du profil d'exactitude, basé sur la notion d'erreur totale (biais + écart type), permettant de simplifier l'approche de la validation d'une procédure analytique tout en contrôlant le risque associé à son utilisation.

1.2.2. Choix du protocole de validation

Selon le logigramme de la figure 03 qui permet de sélectionner un protocole de validation et le tableau III et sachant que : la procédure de dosage est connue ultérieurement, il n'y a pas d'effet matrice et l'étalonnage ne se fait pas à un niveau de concentration, le protocole adopté dans notre étude est le V2 modifié ; en utilisant 5 niveaux de concentration au lieu de trois pour les SE et les SV.

1.2.3. Choix des paramètres de la validation

1.2.3.1 Domaines d'application et les niveaux de concentration

Le choix des niveaux de concentration pour le dosage d'une substance chimique (principe actif) dans le cadre du dosage des comprimés de furosémide.

Dans le présent travail, nous avons opté pour des niveaux de concentration qui englobent la plage des concentrations dissoutes d'un comprimé de 40mg lors de la validation selon le profil d'exactitude de la commission SFSTP (2006) ; de 80% jusqu'à 120% (Cmax) en passant par trois niveaux intermédiaires.

1.2.3.2. Limites d'acceptabilité (λ)

- Elle signifie que pour une concentration de 40 mg /L le résultat sera compris au maximum entre 38 et 42mg/L ; $\lambda = +/- 5\%$.

MATERIEL ET METHODES

1.2.3.3. Probabilité de confiance (β)

$\beta = 95 \%$, on choisit $\geq 95\%$ dans le domaine pharmaceutique.

1.2.3.4. Conditions expérimentales

A. Le choix de la dilution

Pour réaliser un dosage direct, effectuer des dilutions 1/10 à toutes les solutions mères de tous les niveaux de concentration des standards d'étalonnage et de validation (exemple : le niveau 100 % renferme 50 ml de diluant «NaOH» pour 20 mg du principe actif « furosémide »). Cette dilution a été sélectionnée pour des raisons de concentration adéquate à celle du comprimé et pour une meilleure lecture des résultats.

Remarque : selon les bonnes pratiques en HPLC, il est recommandé de vérifier l'absence de particules visibles après la dilution de l'échantillon.

B. Le choix de diluant

Selon la pharmacopée européenne, le furosémide se dissout dans des solvants alcalins. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser l'hydroxyde de sodium fourni gracieusement par le laboratoire de chimie analytique, dosé à 0,1M.

1.2.3.5 Préparation des solutions

A. Préparation du diluant

Dans une fiole jaugée de 1L, mettre 4g des pastilles de NaOH. Ajouter un volume de l'eau distillée, agiter jusqu'à la dissolution totale du NaOH puis compléter au trait de jauge avec le même solvant.

B. Préparation des standards d'étalonnage

- Préparation des solutions mères

Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser les différentes masses correspondantes à chaque niveau de concentration du furosémide, dissoudre dans des volumes suffisants du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

MATERIEL ET METHODES

- Préparation des solutions filles

Effectuer une dilution à $1/10^{\text{ème}}$ en prélevant 5ml à partir de chacune des solutions mères obtenues, à l'aide d'une pipette jaugée de 5ml, dans des fioles de 50ml complétées au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir nos solutions filles.

Tableau XXIV: Masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards d'étalonnage

Niveau	Masse correspondante
80%	16mg
90%	18mg
100%	20mg
110%	22mg
120%	24mg

C. Préparation des standards de validation

- Préparation des solutions mères

Dans des fioles jaugées de 50 ml, peser les différentes masses correspondantes à chaque niveau de concentration du furosémide, dissoudre dans des volumes suffisants du diluant, mettre à l'ultrason pour une dissolution totale puis compléter au trait de jauge avec le même diluant.

- Préparation des solutions filles

Prélever 5ml à partir de chacune des solutions mères obtenues, à l'aide d'une pipette jaugée de 5ml, dans des fioles de 50ml, ajouter 5ml d'une solution placebo déjà préparée et filtrée, complétées au trait de jauge avec le diluant afin d'obtenir nos solutions filles.

Tableau XXV : masses correspondantes pour chaque niveau de concentration des standards de validation

Niveau	Masse correspondante
80%	16mg
90%	18mg
100%	20mg
110%	22mg
120%	24mg

MATERIEL ET METHODES

D. Préparation du placebo

Dans une fiole jaugée de 100 ml peser 90 mg du placebo, dissoudre dans un volume suffisant de diluant, ajuster jusqu'au trait de jauge puis filtrer à l'aide d'un papier filtre.

E. Préparation de la phase mobile

Dans un erlenmeyer de 1L, peser 4.5g Na_2HP_4 et 9g Na_2HPO_4 , compléter avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. A l'aide d'un ph mètre, vérifier le ph ajusté avec d'acide phosphorique jusqu'à obtention de $\text{pH}=5.01$. A partir de cette solution on a versé 350ml dans une éprouvette de 1000ml, ainsi que 650ml d'acétonitrile.

F. Préparation des solutions pour l'étude de la robustesse

L'étude de la robustesse a été effectuée sur deux niveaux de concentration autour de 100% : le 90% et le 110%

Pour chaque niveau de concentration, préparer une solution standard d'étalonnage et deux solutions standards de validation de furosémide.

Ensuite, analyser ces solutions en variant le débit de 0,8 et 1,2ml/min (car nous avons utilisé un débit de 1ml/min) et la longueur d'onde de 275 et 279 nm (car nous avons travaillé à une longueur de 277nm)

G. Préparation des solutions l'étude de la stabilité

Afin d'étudier la stabilité des solutions de furosémide, préparer une solution standard d'étalonnage et deux standards de validation à 100% de furosémide. Ensuite, soumettre les vials remplies de ces solutions dans des conditions variables à des intervalles de temps différents.

Au cours de cette étude, varier le temps, la température et l'effet lumière.

1.2.3.6. Conditions chromatographiques

Les conditions chromatographiques sont résumées dans le tableau suivant :

MATERIEL ET METHODES

Tableau XIII: Conditions chromatographiques de la méthode de dosage

Colonne	Longueur	15 cm
	Diamètre	4,6 mm
	Taille des particules	5 µm
	Phase stationnaire	Gel de silice octadecylesilyle (C18)
Détection	Spectrophotomètre UV-visible : longueur d'onde $\lambda=277$ nm	
Volume d'injection	20µl	
Temps d'analyse	7min	
Débit	1 ml/min	
Température	Ambiante	
Phase mobile	Mélange de : <ul style="list-style-type: none">• 65% de tampon phosphaté (Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 ajusté avec l'acide phosphorique) à pH=5.01• 35% d'acétonitrile	

1.2.4. Préparation de la feuille de calcul

En utilisant le logiciel Excel de microsoft office 2016 enregistré, installé sur le système d'exploitation Windows 10.

L'ensemble des équations rentrant dans l'étude statistique de la validation et la construction du profil d'exactitude sont introduites dans le tableau, pour avoir les résultats complets en tableaux et en graphes si nécessaire juste en introduisant les données brutes en termes de prises d'essais et de leurs réponses instrumentales

Résultats

RESULTATS

2. Résultats

Toutes les données brutes obtenues sont mentionnées en annexe IV

2.1 Spécificité et effet matrice

2.1.3 Comparaison des chromatogrammes

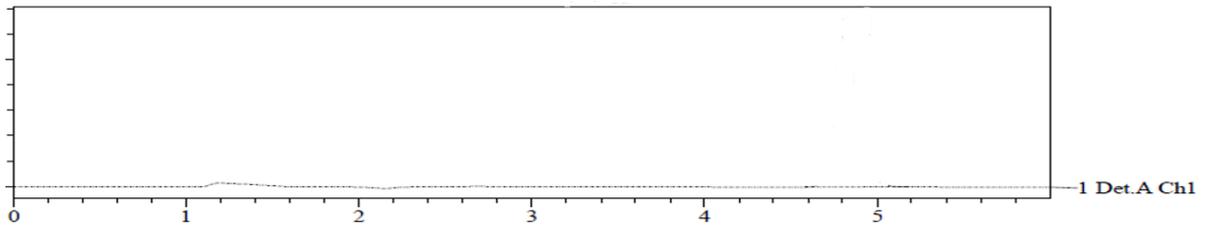


Figure 06 : Chromatogramme du diluant non chargé de PA

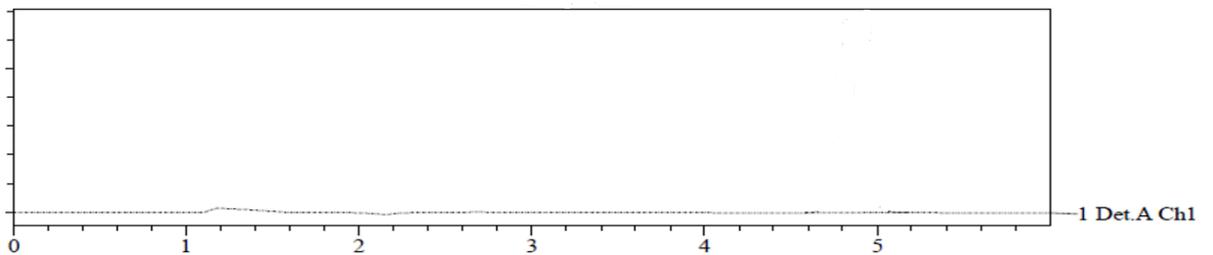


Figure 07 : Chromatogramme du diluant avec placebo non chargé de PA

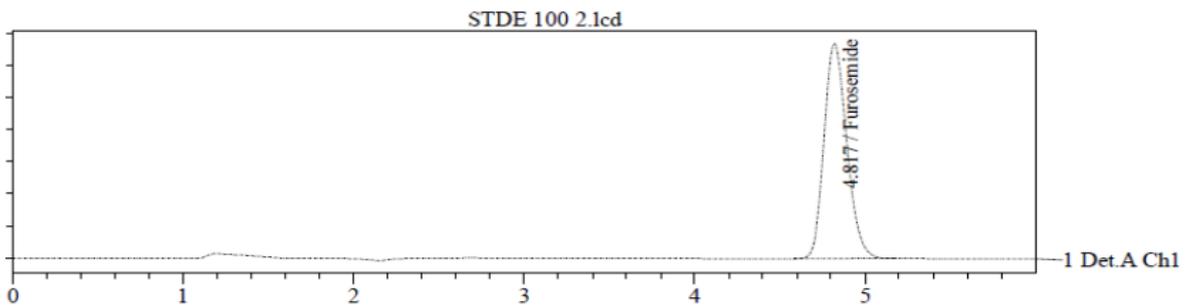


Figure 08 : Chromatogramme du standard d'étalonnage

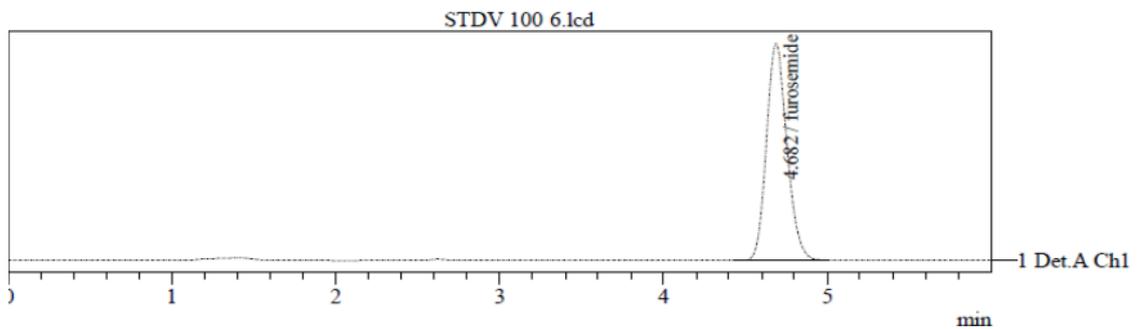


Figure 09 : Chromatogramme du standard de validation

RESULTATS

2.1.2 Confirmation de la spécificité sur les deux gammes d'étalonnage et de validation

Les résultats de la comparaison de deux pentes de la droite de régression sur la gamme sans matrice et la droite obtenue sur la gamme avec matrice sont évalués dans les tableaux suivants :

Tableau XIV: Résultats obtenus sur la gamme SE (Annexe IV)

Standard d'étalonnage						
Niveaux	répétitions de chaque serie	Masses introduites (Xi)	Réponses instrumentales (Yi)	Réponses calculées (Y*i)	$(Y_i - Y^*_i)^2$	$(X_i - X^*_i)^2$
80%	1	16,02	2319830	2305412,08	207876526,23	15,85
	2	16,03	2328823	2307039,51	474520367,14	15,77
90%	1	17,99	2626012	2626016,85	23,48	4,04
	2	18,05	2623459	2635781,46	151842967,45	3,81
100%	1	20,00	2917113	2953131,36	1297322002,24	0,00
	2	20,04	2955052	2959641,10	21059820,20	0,00
110%	1	22,00	3251221	3278618,43	750619278,15	4,00
	2	21,96	3271631	3272108,69	228188,17	3,84
120%	1	24,00	3615040	3604105,51	119563127,04	15,99
	2	23,92	3624760	3591086,02	1133936629,81	15,36
Pente				162743,5378		
Ordonnée à l'origine				-301739,3985		
Erreur pente				2016,311904		
Erreur ordonnée à l'origine				40591,69733		

Tableau XV : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme SE (Annexe II)

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	57,387	Différence significative
	$t^\circ(\alpha; 8)$	2,306	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha; 8)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	5,902	Différence significative
	$t^\circ(\alpha; 8)$	2,306	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ(\alpha; 8)$	

RESULTATS

Tableau XVI : Résultats obtenus sur la gamme SV (Annexe IV)

Niveaux	1ère répétitions de chaque serie	Masses introduites (Xi)	Réponses instrumentales (Yi)	Réponses calculées (Y*i)
80%	1	16,10	2296569	2264342,06
	2	16,09	2252104	2262676,45
	3	15,92	2205483	2234361,01
90%	1	18,05	2530167	2589136,75
	2	18,11	2580358	2599130,44
	3	18,03	2635326	2585805,52
100%	1	19,99	2882426	2912265,83
	2	20,02	2969407	2917262,67
	3	19,94	2949099	2903937,76
110%	1	22,00	3279195	3247054,20
	2	22,00	3231037	3247054,20
	3	22,10	3224762	3263710,34
120%	1	24,21	3610099	3615154,85
	2	24,05	3610099	3588505,03
	3	23,95	3546115	3571848,89
Pente				166561,3793
Ordonnée à l'origine				-417296,1434
Erreur pente				3377,771548
Erreur ordonnée à l'origine				68355,41015

Tableau XVII : Comparaison de la pente et l'ordonnée à l'origine avec 0 sur la gamme SV (Annexe II)

Comparaison de la pente avec 0	t calculé	49,311	Différence significative
	$t^{\circ}(\alpha; 13)$	2,160	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha; 13)$	
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0	t calculé	6,105	Différence significative
	$t^{\circ}(\alpha; 13)$	2,160	
	Condition	$t \text{ calculé} < t^{\circ}(\alpha; 13)$	

RESULTATS

2.1.3 Vérification de l'absence d'effet matrice et d'erreur systématique

Tableau XIII : Comparaison de deux pentes (Annexe II)

Comparaison des pentes a_1 et a_2 des deux droites de régression	t calculé	0,353
	$t^\circ (\alpha; 21)$	2,08
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (\alpha; 21)$
	Résultat	Non Significatif
Comparaison des ordonnées à l'origine b_1 et b_2 des deux droites de régression	t calculé	0,829
	$t^\circ (\alpha; 21)$	2,08
	Condition	$t \text{ calculé} < t^\circ (\alpha; 21)$
	Résultat	Non Significatif

2.2 Fonction de réponse

La relation existante entre l'air du pic (réponse instrumentale) et la masse introduite dans les standards d'étalonnage (concentration), obtenue sur chacune des trois séries est représentée pour cinq modèles mathématiques comme suit :

RESULTATS

- Modèle : $y=ax +b$

Tableau XIX : Résultats obtenus pour la fonction $y=ax+b$ (Annexe IV)

Série 01			Série 02			Série 03		
Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne
16,02	2319830		16,03	2328823		16,10	2283672	16,10
16,02	2347658	16,02	16,03	2336033	16,03	16,10	2347922	
17,99	2626012	17,99	18,05	2623459	18,05	18,02	2593195	18,02
17,99	2653268		18,05	2632102		18,02	2630582	
20,00	2917113	20,00	20,04	2955052	20,04	20,07	2960781	20,07
20,00	2975071		20,04	2954552		20,07	2942655	
22,00	3251221	22,00	21,96	3271631	21,96	22,00	3266181	22,00
22,00	3282910		21,96	3268075		22,00	3294575	
24,00	3615040	24,00	23,92	3624760	23,92	24,00	3686964	24,00
24,00	3635672		23,92	3692608		24,00	3688415	
Moyenne totale		20,002	Moyenne totale		20,00	Moyenne totale		20,038
Pente	160779,2505		Pente	167261,6023		Pente	172530,38	
Origine	-253527,069		Origine	-376522,5455		Origine	-487669,7188	

RESULTATS

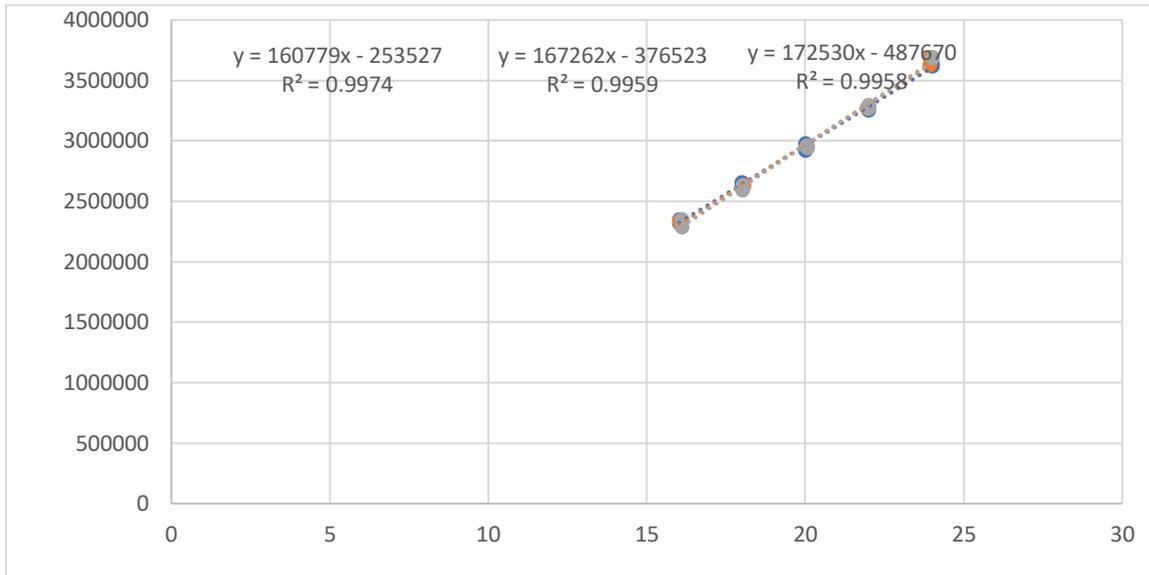


Figure 10 : Courbe de fonction de réponse $y=ax+b$

RESULTATS

- Modèle : $\ln y=f(\ln x)$

Tableau XX : Résultats obtenus pour la fonction $\ln y=f(\ln x)$ (Annexe IV)

Série 01			Série 02			Série 03		
Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne
2,77383794	14,6570045	2,77383794	2,77446197	14,6608735	2,77446197	2,77881927	14,6412952	2,77881927
2,77383794	14,6689288		2,77446197	14,6639647		2,77881927	14,6690412	
2,88981605	14,7809769	2,88981605	2,89314568	14,7800042	2,89314568	2,89148225	14,7684013	2,89148225
2,88981605	14,7913026		2,89314568	14,7832933		2,89148225	14,7827157	
2,99573227	14,886105	2,99573227	2,99773028	14,8990268		2,99922616	14,9009636	2,99922616
2,99573227	14,9057785		2,99773028	14,8988576	2,99773028	2,99922616	14,8948228	
3,09104245	14,9945412	3,09104245	3,08922262	15,0007992	3,08922262	3,09104245	14,999132	3,09104245
3,09104245	15,0042408		3,08922262	14,9997117		3,09104245	15,0077877	
3,17805383	15,1006135	3,17805383	3,17471493	15,1032986	3,17471493	3,17805383	15,1203139	3,17805383
3,17805383	15,1063045		3,17471493	15,1218435		3,17805383	15,127074	
Moyenne totale		2,978014594	Moyenne totale		2,9858552	Moyenne totale		2,987724792
Pente	1,08236577		Pente	1,11942729		Pente	1,15831864	
Origine	11,6579639		Origine	11,5487197		Origine	11,4297808	

RESULTATS

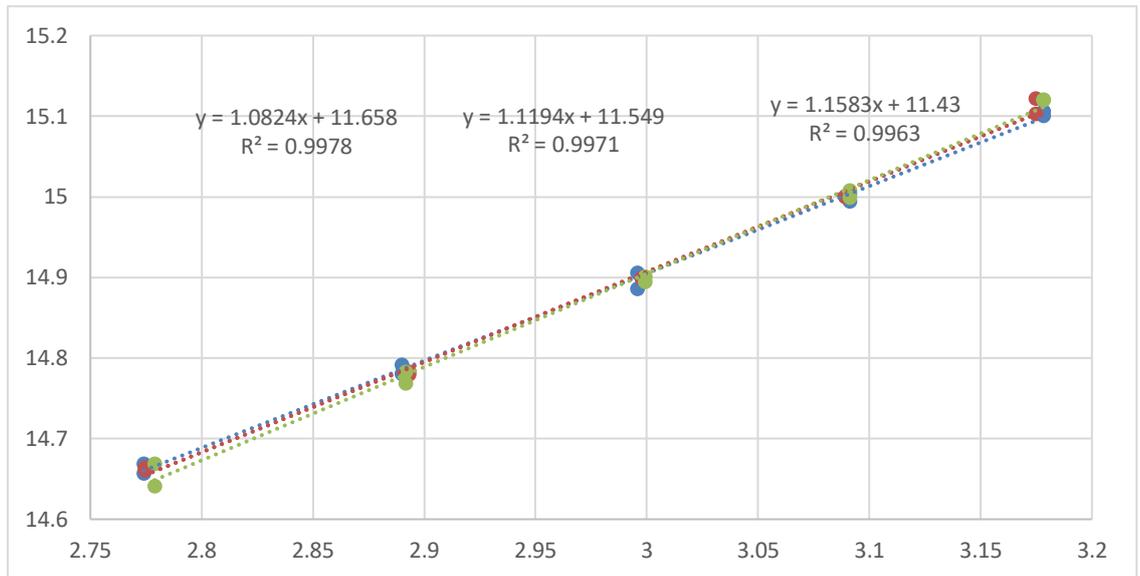


Figure 11 : Courbe de fonction de réponse Ln y=f(Lnx)

RESULTATS

- Modèle : $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

Tableau XXI: Résultats obtenus pour la fonction $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$ (Annexe IV)

Série 01			Série 02			Série 03		
Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne
4,00249922	1523,09881	4,00249922	4,00374824	1526,04816	4,00374824	4,01248053	1511,18232	4,01248053
4,00249922	1532,20691		4,00374824	1528,40865		4,01248053	1532,29305	
4,24146201	1620,49745		4,24852916	1619,70954		4,24499706	1610,34003	
4,24146201	1628,88551	4,24146201	4,24852916	1622,37542	4,24852916	4,24499706	1621,9069	4,24499706
4,47213595	1707,9558		4,47660586	1719,02647		4,47995536	1720,69201	
4,47213595	1724,83941	4,47213595	4,47660586	1718,88103	4,47660586	4,47995536	1715,41686	4,47995536
4,69041576	1803,11425		4,68614981	1808,76505		4,69041576	1807,25787	
4,69041576	1811,88024	4,69041576	4,68614981	1807,78179	4,68614981	4,69041576	1815,09642	4,69041576
4,89897949	1901,32585	4,89897949	4,8908077	1903,88025	4,8908077	4,89897949	1920,14687	4,89897949
4,89897949	19,0674382		4,8908077	1921,61599		4,89897949	1920,52467	
Moyenne totale		4,510943196	Moyenne totale		4,461168154	Moyenne totale		4,46536564
Pente	417,004166		Pente	432,493477		Pente	446,738801	
Origine	-144,24185		Origine	-211,77689		Origine	-277,36639	

RESULTATS

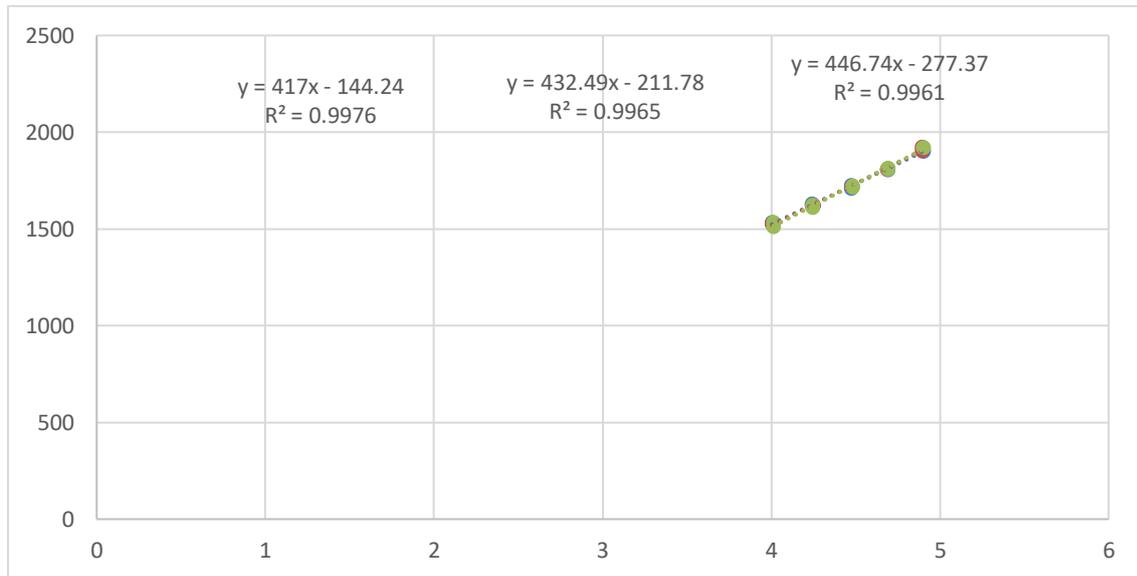


Figure 12 : Courbe de fonction de réponse $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

RESULTATS

- Modèle : $y=ax$:

Tableau XXII: Résultats obtenus pour la fonction $y=ax$ (Annexe IV)

Série 01			Série 02			Série 03		
Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne	Variable	Réponse	Moyenne
16,02	2319830		16,03	2328823		16,10	2283672	16,10
16,02	2347658	16,02	16,03	2336033	16,03	16,10	2347922	
17,99	2626012	17,99	18,05	2623459	18,05	18,02	2593195	18,02
17,99	2653268		18,05	2632102		18,02	2630582	
20,00	2917113	20,00	20,04	2955052	20,04	20,07	2960781	20,07
20,00	2975071		20,04	2954552		20,07	2942655	
22,00	3251221	22,00	21,96	3271631	21,96	22,00	3266181	22,00
22,00	3282910		21,96	3268075		22,00	3294575	
24,00	3615040	24,00	23,92	3624760	23,92	24,00	3686964	24,00
24,00	3635672		23,92	3692608		24,00	3688415	
Moyenne totale		20,002	Moyenne totale		20,00	Moyenne totale		20,038
Pente	148352		Pente	148794		Pente	148658	
Origine	0		Origine	0		Origine	0	

RESULTATS

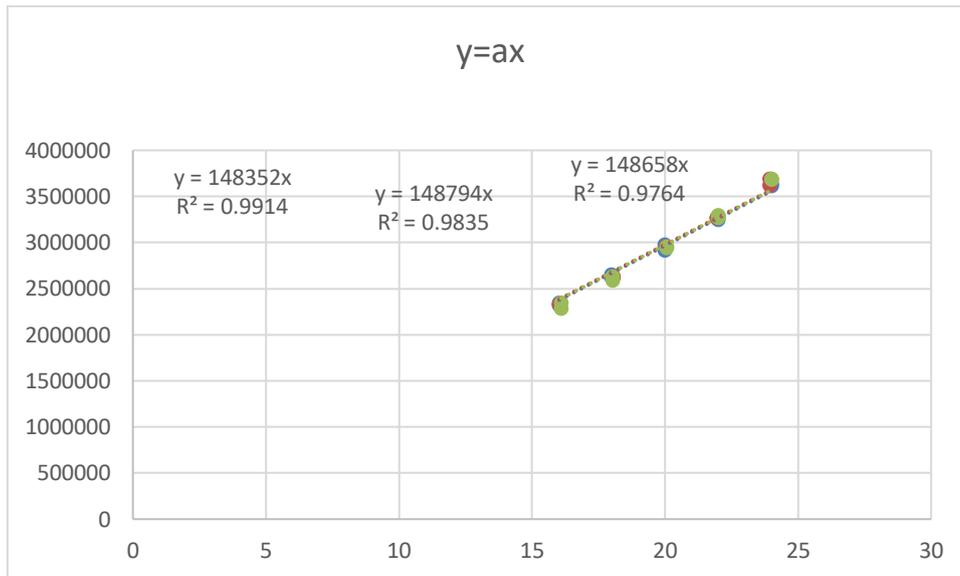


Figure 13 : courbe de fonction de réponse $y=ax$

2.2.1. Critères de choix de la fonction de réponse

Pour le choix de la fonction de réponse, qui est capable de produire une proportion suffisante des futurs résultats qui se situeront à l'intérieur de la zone d'acceptabilité $[-5, +5]$, nous pouvons procéder par deux méthodes soit :

- Par le calcul des indices : d'intervalle de dosage, de justesse, de fidélité et d'exactitude.
- Par comparaison des profils d'exactitude.

Dans le présent travail nous avons généré pour chaque fonction un profil d'exactitude présenté dans les figures suivantes

RESULTATS

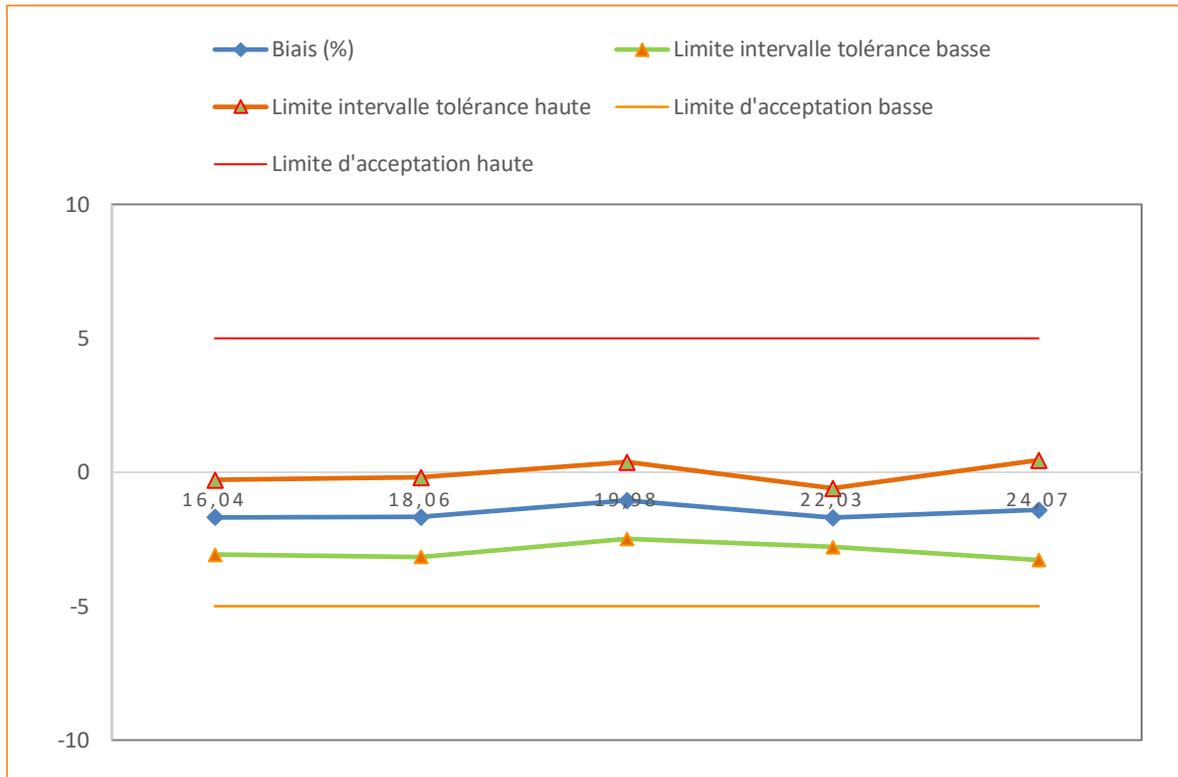


Figure 14 : Courbe du profil d'exactitude avec la fonction $y = ax + b$

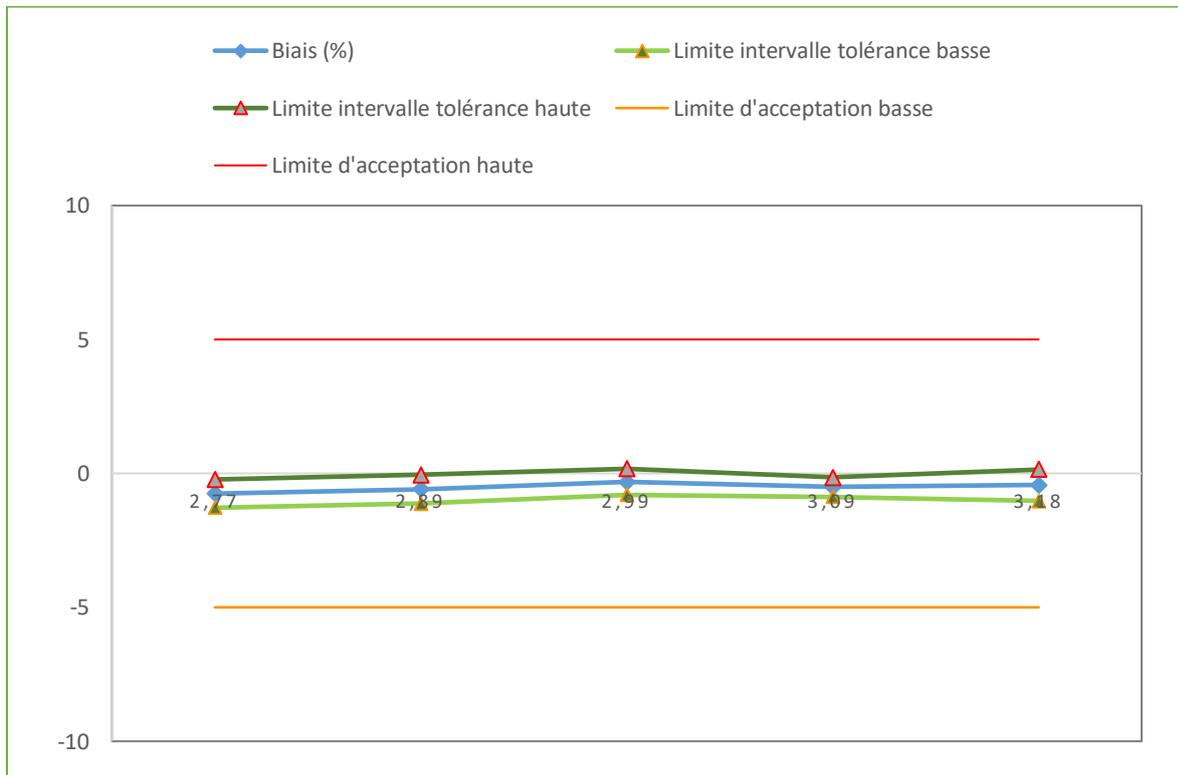


Figure 15 : Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $\ln y = f(\ln x)$

RESULTATS

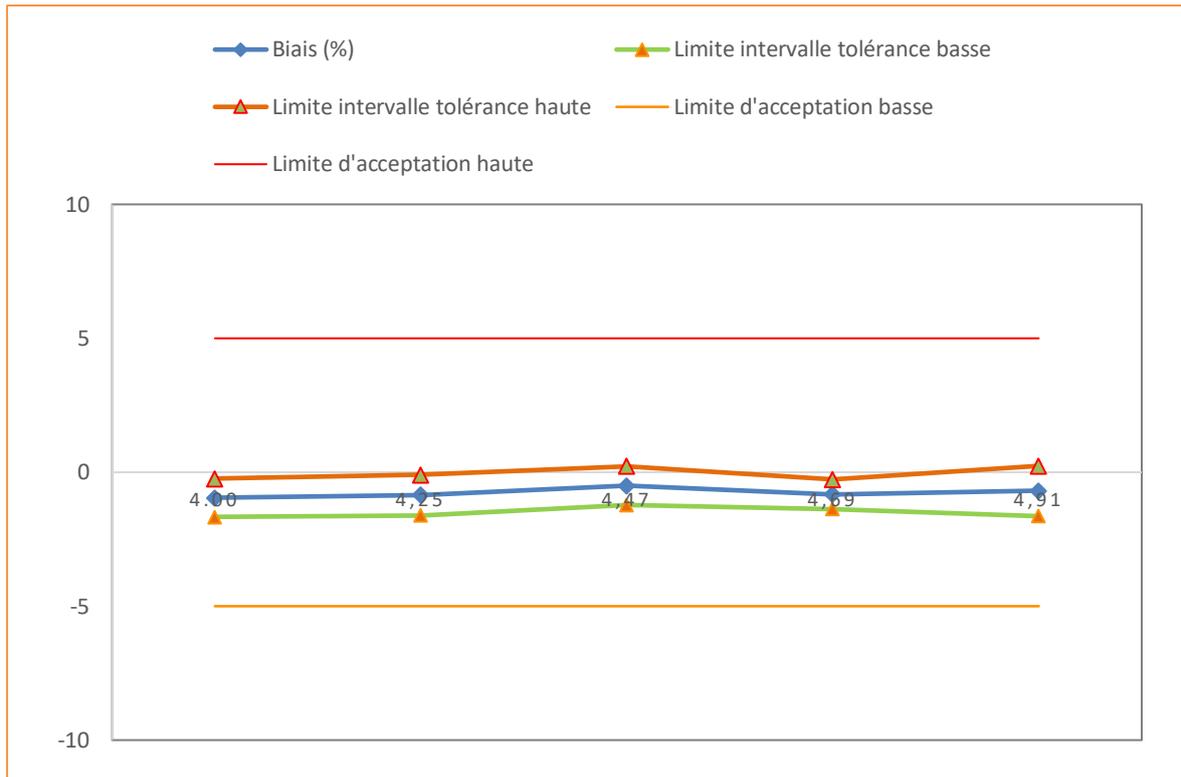


Figure 16 : Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $\sqrt{Y} = f(\sqrt{X})$

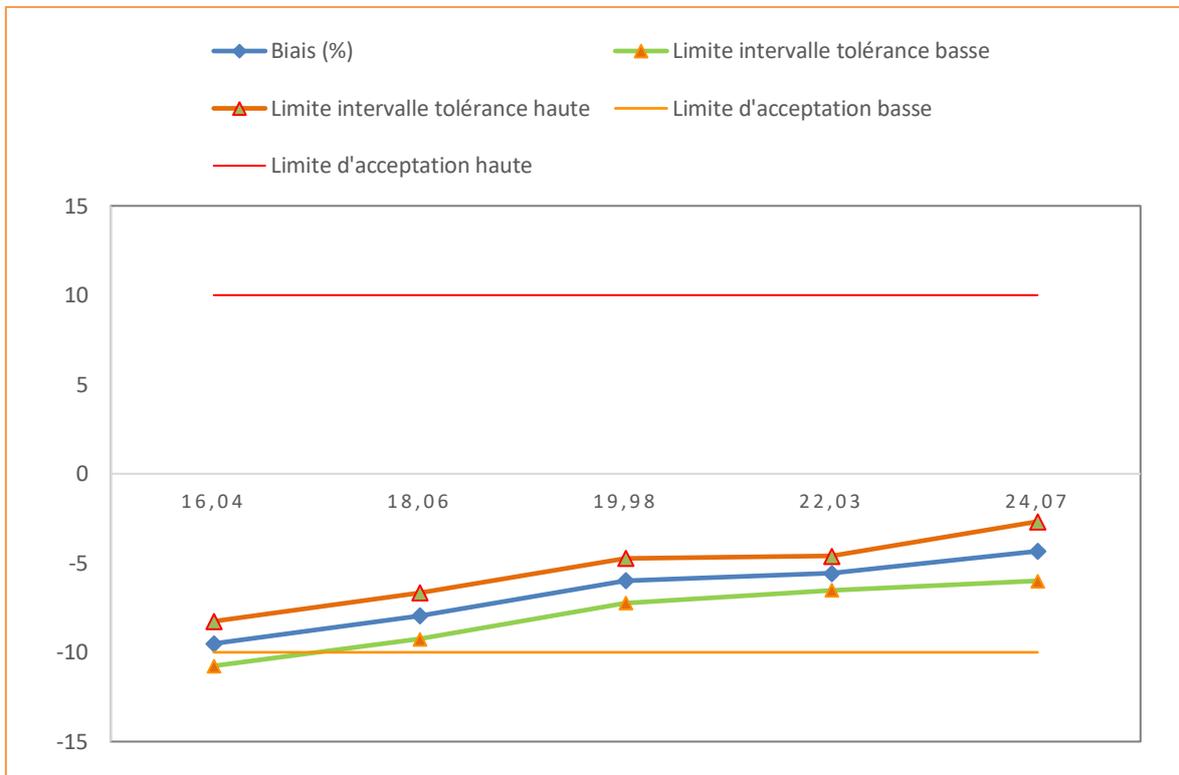


Figure 17 : Courbe du profil d'exactitude obtenue avec la fonction $y = ax$

RESULTATS

Le choix du profil d'exactitude est basé sur l'objectif de trouver des biais plus proches à zéro, avec un intervalle de tolérance le plus étroit et situé à l'intérieur des limites d'acceptabilité, pour avoir une méthode valide dans l'intervalle de concentration étudiée.

Après avoir examiné soigneusement les profils d'exactitude des différents modèles et en fonction de ces motifs de choix, nous avons sélectionné :

- Le modèle régression linéaire $y = ax + b$

Vu sa simplicité et sa facilité de mise en œuvre dans l'analyse de routine le modèle régression linéaire est le plus adéquat.

2.3 Alignement des observations

Comme pour chaque niveau de concentrations, les quantités introduites ne sont pas identiques, l'alignement des réponses sur la moyenne des concentrations introduites est exigé.

L'alignement des réponses obtenues avec les échantillons de validation est résumé dans le tableau suivant

RESULTATS

Tableau XXIII : Alignement des observations (Annexe IV)

Rp	Série 01			Série 02			Série 03			
	Pe (mg)	Air du pic	Réponses Alignées	Pe (mg)	Air du pic	Réponses Alignées	Pe (mg)	Air du pic	Réponses Alignées	
80	1	16,10	2296569	2286386,314	16,09	2252104	2243183,381	15,92	2205483	2225611,545
	2	16,10	2305631	2295448,314	16,09	2284376	2275455,381	15,92	2199888	2220016,545
	3	16,10	2280743	2270560,314	16,09	2296042	2287121,381	15,92	2199679	2219807,545
90	1	18,05	2530167	2532310,723	18,11	2580358	2572552,459	18,03	2635326	2641077,013
	2	18,05	2588139	2590282,723	18,11	2593128	2585322,459	18,03	2633331	2639082,013
	3	18,05	2561457	2563600,723	18,11	2574648	2566842,459	18,03	2632276	2638027,013
100	1	19,99	2882426	2881354,138	20,02	2969407	2963274,075	19,94	2949099	2956575,317
	2	19,99	2924196	2923124,138	20,02	2938931	2932798,075	19,94	2927726	2935202,317
	3	19,99	2879195	2878123,138	20,02	2934760	2928627,075	19,94	2939088	2946564,317
110	1	22,00	3279195	3284554,308	22,00	3231037	3236612,387	22,10	3224762	3213259,974
	2	22,00	3243142	3248501,308	22,00	3243142	3248717,387	22,10	3235419	3223916,974
	3	22,00	3257305	3262664,308	22,00	3207305	3212880,387	22,10	3248090	3236587,974
120	1	24,21	3610099	3587589,905	24,05	3610099	3613444,232	23,95	3546115	3566818,647
	2	24,21	3609515	3587005,905	24,05	3609515	3612860,232	23,95	3549732	3570435,647
	3	24,21	3626441	3603931,905	24,05	3526441	3529786,232	23,95	3583780	3604483,647

RESULTATS

2.4 Prédiction inverses

Les prises d'essai prédites avec la fonction de réponse choisie sont présentées dans le tableau ci-dessous :

RESULTATS

Tableau XXIV : Prédiction inverses obtenues avec le SV (Annexe IV)

%	Rep	Série 1		Série 2		Série 3		Prédiction inverses $x_{ijk,calc}$		
		Prise d'essai en mg	Aire du pic	Prise d'essai en mg	Aire du pic	Prise d'essai en mg	Aire du pic	Série 1	Série 2	Série 3
80	1	16,10		16,09		15,92	2205483	15,798	15,662	15,726
	2	16,10	2296569	16,09	2252104	15,92	2199888	15,854	15,855	15,694
	3	16,10	2305631	16,09	2284376	15,92	2199679	15,699	15,925	15,693
90	1	18,05	2280743	18,11	2296042	18,03	2635326	17,327	17,632	18,134
	2	18,05	2530167	18,11	2580358	18,03	2633331	17,688	17,708	18,123
	3	18,05	2588139	18,11	2593128	18,03	2632276	17,522	17,597	18,117
100	1	19,99	2561457	20,02	2574648	19,94	2949099	19,498	19,968	19,963
	2	19,99	2882426	20,02	2969407	19,94	2927726	19,758	19,785	19,839
	3	19,99	2924196	20,02	2938931	19,94	2939088	19,478	19,760	19,905
110	1	22,00	2878195	22,00	2934760	22,10	3224762	22,006	21,602	21,451
	2	22,00	3279195	22,00	3231037	22,10	3235419	21,782	21,674	21,513
	3	22,00	3243142	22,00	3243142	22,10	3248090	21,870	21,460	21,586
120	1	24,21	3257305	24,05	3610099	23,95	3546115	23,891	23,855	23,500
	2	24,21	3610099	24,05	3609515	23,95	3549732	23,887	23,851	23,521
	3	24,21	3609515	24,05	3526441	23,95	3583780	23,992	23,354	23,718

RESULTATS

2.5. Justesse

Comme indiqué dans le tableau ci-dessous, la justesse est exprimée en termes de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Tableau XXV : Justesse calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	Moyenne des concentrations introduites (unit)	Moyenne des concentrations calculées (unit)	Biais absolu (unit)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)
1.0	16,04	15,76	-0,28	-1,68	98,25
2.0	18,06	17,76	-0,3	-1,67	98,32
3.0	19,98	19,77	-0,21	-1,05	98,94
4.0	22,03	21,66	-0,37	-1,69	98,30
5.0	24,07	23,72	-0,35	-1,41	98,58

2.6. Fidélité :

La fidélité de notre méthode est évaluée dans de conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire. Elle est calculée pour chaque niveau de concentration, exprimée en écart type et en termes de coefficient de variation est résumée dans le tableau suivant :

RESULTATS

Tableau XXVI : Fidélité calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation.

Niveau de concentration (ratio)	MSM	MSE	Ecart type Intra-série	Ecart type inter-série	Fidélité intermédiaire	CV de répétabilité	CV de fidélité intermédiaire
80%	0,0307	0,00765	0,05057997	0,087607077	0,138187047	0,546292313	0,861694328
90%	0,0052	0,0013	0,02081666	0,036055513	0,056872173	0,199606086	0,314848714
100%	0,0049	0,001225	0,020207259	0,035	0,055207259	0,175145955	0,276266519
110%	0,01	0,0025	0,028867513	0,05	0,078867513	0,226928896	0,357946355
120%	0,0516	0,0129	0,065574385	0,113578167	0,179152552	0,471866086	0,744298098

2.7. Exactitude

Le tableau ci-dessous présente l'exactitude relative calculée pour chaque niveau de concentration des standards de validation

RESULTATS

Tableau XXVII : Résultats de calcul de l'exactitude

Concentration introduite	Concentration prédite	Exactitude relative	Concentration introduite	Concentration prédite	Exactitude relative	Concentration introduite	Concentration prédite	Exactitude relative (%)
16,10	15,798	1,879	16,09	15,662	2,658	15,92	15,726	1,216
16,10	15,854	1,529	16,09	15,855	1,459	15,92	15,694	1,420
16,10	15,699	2,490	16,09	15,925	1,025	15,92	15,693	1,427
18,05	17,327	4,005	18,11	17,632	2,642	18,03	18,134	-0,579
18,05	17,688	2,007	18,11	17,708	2,221	18,03	18,123	-0,515
18,05	17,522	2,927	18,11	17,597	2,831	18,03	18,117	-0,481
19,99	19,498	2,461	20,02	19,968	0,262	19,94	19,963	-0,116
19,99	19,758	1,161	20,02	19,785	1,172	19,94	19,839	0,505
19,99	19,478	2,562	20,02	19,760	1,297	19,94	19,905	0,175
22,00	22,006	-0,027	22,00	21,602	1,810	22,10	21,451	2,937
22,00	21,782	0,993	22,00	21,674	1,481	22,10	21,513	2,658
22,00	21,870	0,592	22,00	21,460	2,455	22,10	21,586	2,325
24,21	23,891	1,319	24,05	23,855	0,812	23,95	23,500	1,878
24,21	23,887	1,334	24,05	23,851	0,827	23,95	23,521	1,791
24,21	23,992	0,899	24,05	23,354	2,892	23,95	23,718	0,967

RESULTATS

2.8. Erreur totale et profil d'erreur totale

L'erreur totale et l'erreur totale relative calculées pour chaque niveau de concentration sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau XXIII : Calcul de l'erreur totale pour chaque niveau de concentration des standards de validation

Niveau de concentration (ratio)	Erreur totale absolue	Erreur totale relative
1.0	0,407495553	2,541024025
2.0	0,35938498	1,989582838
3.0	0,265822774	1,33022239
4.0	0,451941422	2,051171356
5.0	0,5191663	2,156901951

2.9. Intervalle de tolérance

Les limites de tolérance sont calculées pour chaque niveau de concentration, les résultats obtenus sont dans le tableau ci-dessous :

Tableaux XXIX : Calcul des limites de tolérance pour chaque niveau de concentration j.

	16,04	18,06	19,07	22,03	24,07
Biais (%)	-1,68	-1,67	-1,05	-1,69	-1,41
Limite intervalle tolérance basse	-3,07	-3,16	-2,49	-2,79	-3,28
Limite intervalle tolérance haute	-0,29	-0,19	0,38	-0,60	0,45
Limite d'acceptation basse	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00	-5,00
Limite d'acceptation haute	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00

2.10. Profil d'exactitude

Parmi les différents modèles, nous avons opté pour le modèle de régression linéaire pour la validation de la méthode de dosage de l'Furosémide qui est illustré dans le profil d'exactitude indiqué dans la figure suivante :

RESULTATS

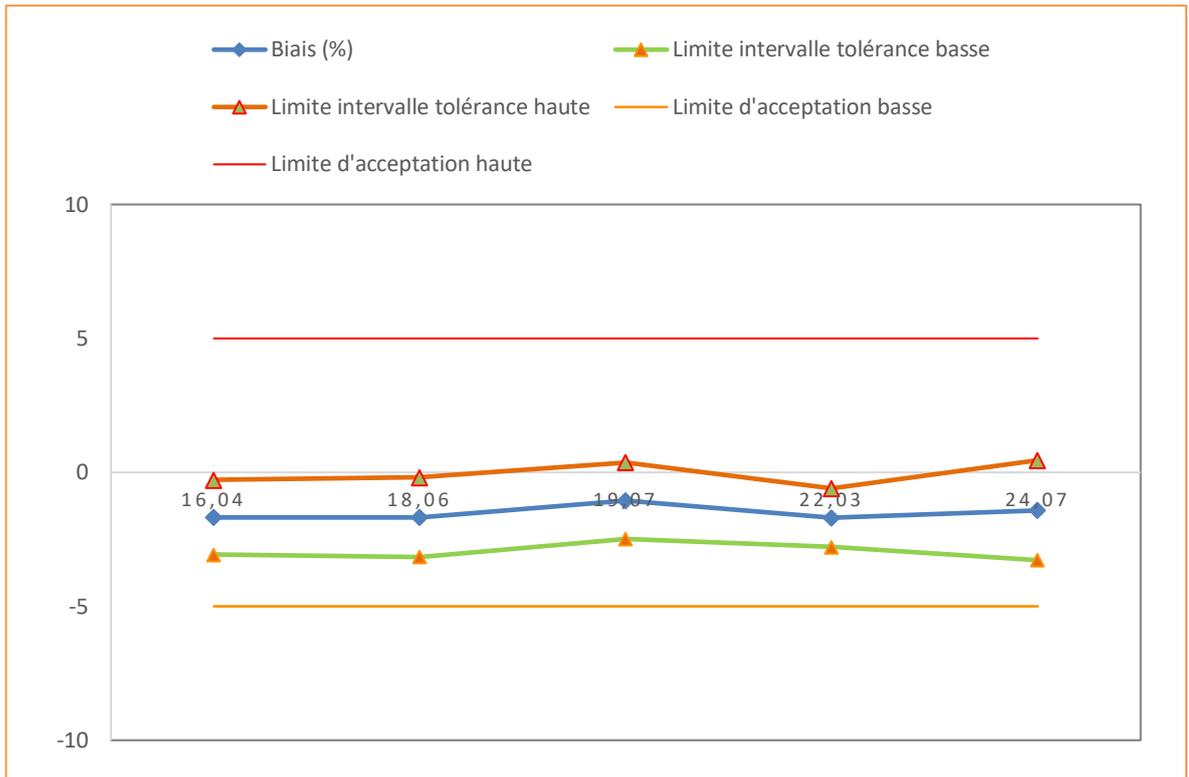


Figure 18 : Tracé du profil d'exactitude pour la fonction $y=ax+b$.

2.11. Linéarité

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante :

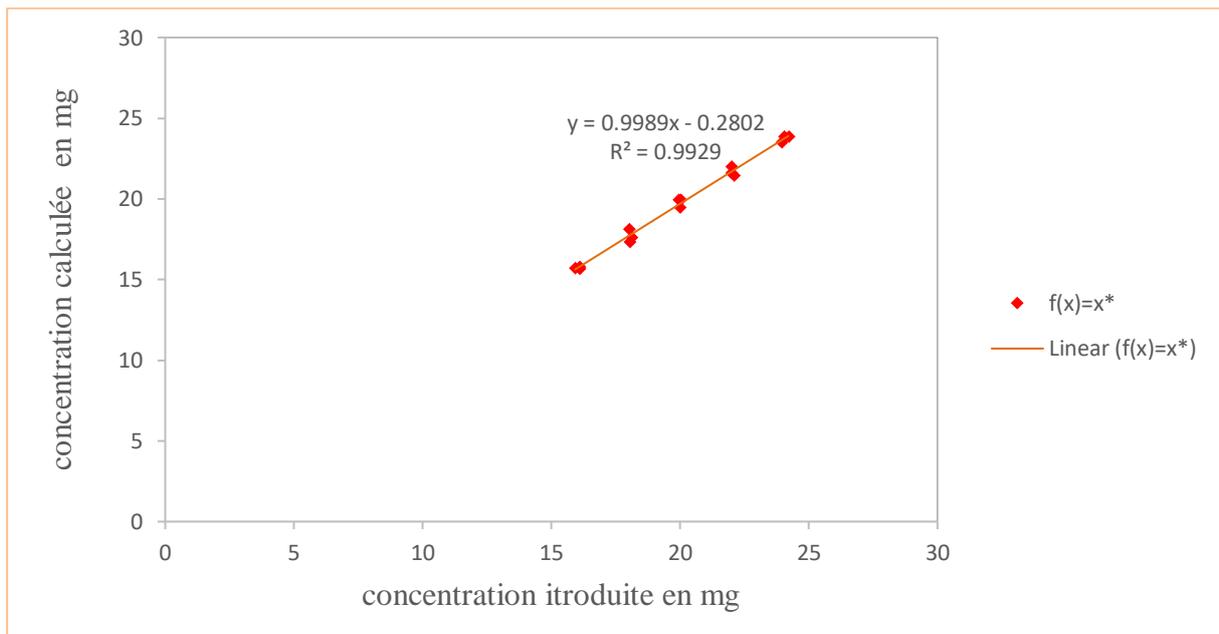


Figure 19 : Courbe de linéarité obtenue avec la fonction $y=ax+b$

RESULTATS

Tableau XXX : Masses prédites en fonction des masses introduites

Variables (masses introduites en mg)	Prédictions inverses (masses prédites en mg)
16,10	15,80
16,09	15,79
15,92	15,62
18,05	17,75
18,11	17,81
18,03	17,73
19,99	19 ;69
20 ,02	19,72
19,94	19,64
22,00	21,69
22,00	21,69
22,10	21,79
24,21	23,90
24,05	23,74
23,95	23,64
la pente	0,998850864
L'écart type de la pente	0,23469085
L'ordonnée à l'origine	-0,28018599
L'écart type de l'ordonnée à l'origine	0,474940036

2.12. Limites de quantification et intervalle de dosage

Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitudes, c'est-à-dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β sortent des limites d'acceptation.

Selon les profils d'exactitude des modèles adéquats représentés précédemment, aucune concentration ne sort de l'intervalle de tolérance, donc nous pouvons considérer la limite de quantification inférieure comme étant la plus petite concentration étudiée, et la limite de quantification supérieure correspondant à la plus grande concentration.

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieures et supérieures de quantification ou la procédure analytique atteint l'exactitude souhaité

Limite inférieure de quantification (LQ_{inf}) (Unit) = 0,32 mg/ml.

Limite supérieure de quantification (LQ_{sup}) = 0 .48 mg/ml

RESULTATS

2.13. Robustesse

Tableau XXXI : Résultats de l'étude de la robustesse.

Masse (concentration) pour une teneur théorique de 100%				20	Mg					
N° de l'essai	Facteur A : teneur en %	Facteur B : Débit de la phase mobile	Facteur C : longueur d'onde d'excitation	Masse introduite (concentration) de l'échantillon	Masse du standard	Teneur introduite en %	Aire (absorbance) échantillon	Aire (absorbance) standard	Masse (Concentration) estimée	Réponse (Teneur %)
1	90%	0,8	275	18,02	20,02	100,11	3497045	3553209	19,70	98,52
2	110%	0,8	275	22,03	20,02	122,39	3997045	3553209	22,52	112,60
3	90%	1,2	275	18,02	20,02	100,11	3390637	3487479	19,46	97,32
4	110%	1,2	275	22,03	20,02	122,39	3668376	3487479	21,06	105,29
5	90%	0,8	279	18,02	20,02	100,11	2979858	3123639	19,10	95,49
6	110%	0,8	279	22,03	20,02	122,39	3419508	3123639	21,92	109,58
7	90%	1,2	279	18,02	20,02	100,11	2276384	2376960	19,17	95,86
8	110%	1,2	279	22,03	20,02	122,39	2511806	2376960	21,16	105,78
									Ecart type	6,62
									t°(0,05,7)	2,36

RESULTATS

2.14. Stabilité des solutions

Préparer 3 solutions à un niveau de concentration 100% pour les mettre dans 3 conditions différentes.

Tableau XXXII : Résultats de l'étude de la stabilité

	0	1 ^{er} jour					4 ^{ème} jour	
		Heure	Heure	Heures	heures	heures	Prise d'essais (mg)	Aire du pic
	Prise d'essais (mg)	Aire du pic					Prise d'essais (mg)	Aire du pic
Blanc	0	0					0	0
SE	19,98	2999180					19,98	2993235
SV à l'abri de la lumière	20,01	2991230					2966199	2819349
SV à l'air libre	20,01	2987345					2938735	2800134
SV à température élevée (40 °C)	20,01	2857234					2803038	2697657
SV à température basse (-4 °C)	20,01	2874567					2833679	2700789
SV à l'abri de la lumière		99,8844737 %					99,259762 %	96,35780088 %
SV à l'air libre		99,760687 %					98,3289762 %	95,70893356 %
SV à température élevée (40 °C)		95,40805168 %					93,78415346 %	92,20841386 %
SV à température basse (-4 °C)		95,9885304 %					94,869365 %	92,31906764 %

Discussions

DISCUSSION

3. Discussion

3.1. Spécificité

Comparaison des deux pentes a_1 et a_2 :

$$t_{\text{calculé}} = 0,353$$

$t^{\circ}(\alpha ; 21)$ lu sur la table de student = 2,08. (Annexe II)

$t_{\text{calculé}} < t^{\circ}(\alpha ; 21) \rightarrow$ les deux pentes ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ considéré, donc on conclue l'absence d'effet matrice.

Comparaison des deux ordonnées à l'origine b_1 et b_2 :

$$t_{\text{calculé}} = 0,829$$

$t^{\circ}(\alpha ; 21)$ lu sur la table de student = 2,08. (Annexe II)

$t_{\text{calculé}} < t^{\circ}(\alpha ; 21) \rightarrow$ Les deux ordonnées a l'origine ne sont pas significativement différentes au risque $\alpha = 5\%$ considéré, ce qui explique une absence d'erreur systématique.

La discussion des résultats obtenus est résumée dans le tableau suivant :

Tableau XXXIII : Signification des résultats des deux pentes et des deux ordonnées à l'origine entre elles.

Test	Résultat	Signification
Les pentes sont-elles comparables ?	Oui	Absence d'effet matrice
Les ordonnées à l'origine sont-elles comparables ?	Oui	Absence d'erreur systématique

On peut dire qu'avec un risque de 5%, statistiquement la méthode est spécifique ainsi qu'une absence d'effet matrice et d'erreurs systématiques confirmée.

3.2. Choix de la fonction de réponse

D'après les profils d'exactitude représentés dans les figures précédentes (n° :14, 15 ,16, 17) le modèle d'étalonnage sélectionné est soit :

Régression linéaire avec une équation $y = ax + b$

Ou :

Fonction logarithmique népérien $\text{Ln } y = (\text{Ln } x)$

Ou :

Fonction racine carrée $\sqrt{y} = f(\sqrt{x})$

En raison de la simplicité du modèle nous avons opté pour la fonction linéaire $y = ax + b$.

DISCUSSION

3.3. Critères de performance de la fonction de réponse choisie

3.3.1. Justesse

L'accord entre la valeur de la concentration moyenne prédite obtenue à partir des trois séries de validation et la valeur de la moyenne des concentrations théoriques considérée comme étant la valeur de référence est assez étroit pour tous les niveaux en tenant compte que les biais relatifs de ces derniers sont inférieurs à 1%, donc la méthode est juste.

3.3.2. Fidélité

La fidélité de la méthode de dosage est exprimée par le coefficient de variation (% CV) obtenu en effectuant le rapport entre l'écart-type et la moyenne des réponses.

La répétabilité et la fidélité intermédiaires ont été observées à tous les niveaux de concentration. La méthode sera considérée comme fidèle si les coefficients de variation de la fidélité intra-série sont inférieurs à 1%.

Compte tenu des valeurs obtenues des CV, la fidélité intra-série de la méthode est jugée satisfaisante, la méthode est donc fidèle.

3.4. Critères de décision sur la validité de la méthode

3.4.1. Erreur totale

Selon le tableau montrant les résultats de l'erreur totale, on juge que tous les niveaux de concentration sont inclus dans l'intervalle d'acceptabilité.

3.4.2. Profil d'exactitude

Les limites de tolérance supérieure et inférieure n'interceptent pas avec les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure, donc la méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées à priori ;

Cela signifie que l'analyste peut garantir que la méthode est capable de produire une proportion de 95% des résultats acceptables et seulement 5% des futures mesures d'échantillons inconnus peuvent être en dehors de ces limites ;

DISCUSSION

Le domaine de validité de la méthode est donc compris entre les niveaux de concentrations 80% et 120%.

3.4.3. Limites de quantification et intervalle de dosage

La méthode est considérée comme valide dans l'intervalle [0,32 mg/ml ; 0,48 mg/ml] pour lequel le profil d'exactitude est inclus dans les limites d'acceptation choisies : [-5% ; +5%] avec un risque d'avoir au maximum 5% des mesures en dehors des limites d'acceptation.

3.5. Linéarité

La linéarité a été évaluée à partir de cinq niveaux de concentration (80, 90, 100, 110, 120) avec trois répétitions indépendantes pour chaque (n= 3). La droite de régression linéaire est obtenue sous la forme $y=ax +b$, où a représente la pente de la droite et b l'ordonnée à l'origine (figure n° 19). Y représente la concentration prédite et x la concentration introduite en mg/ml.

Le coefficient de détermination R^2 vaut 0,9929, ce qui signifie que la variabilité totale de l'aire du pic est expliquée à ...par la variabilité de la concentration de l'échantillon en solution. L'analyse de variance de la régression permet de vérifier l'existence d'une pente significative différente de zéro et l'existence d'une ordonnée à l'origine.

La linéarité de la droite : concentrations prédites =f (concentrations introduites) est confirmée par :

- Un coefficient de détermination acceptable $R^2=0,992$ Une pente significativement différente de zéro donc il existe une relation linéaire.
De plus elle est comparable à 1 au risque 5% ($a =0,9989$)
- Une ordonnée à l'origine comparable à zéro au risque 5% ($b=-0.2802$)

3.6. Robustesse

D'après les résultats du tableau XXXII, nous avons constaté que la méthode est influencée par le facteur A (concentration) et non pas par le facteur B (débit) et facteur C (longueur d'onde). Ce qui nous permet de juger la méthode comme sensible aux variations de la concentration.

3.7. Stabilité des solutions

Selon les résultats du tableau XXXIII, nous avons remarqué que la stabilité des solutions incubées est altérée par l'effet de la lumière et de la température. Cette altération est

DISCUSSION

due aux forces électrostatiques de furosémide, c'est pour cela il est recommandé de conserver le furosémide à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Synthèse des résultats

La spécificité, la linéarité de la méthode de dosage de furosémide dans des comprimés dosés à 40 mg par HPLC mise au point dans le présent travail sont démontrés dans l'intervalle de dosage [0,32 ;0,48] mg/ml avec une probabilité de confiance de 95% dans les limites d'acceptation définies $\pm 5\%$. Autrement dit, 95% des futurs résultats fournis par la méthode analytique développée seront inclus dans les limites d'acceptabilité et les limites de dosage. L'utilisation de l'HPLC avec une détection dans le domaine de l'Ultraviolet comme méthode de dosage a permis d'obtenir des résultats plus exacts, plus précis et plus spécifiques (méthode séparative) dans un intervalle de dosage [0,38 ;0,42] mg/ml.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Le contexte industriel impose aux entreprises pharmaceutiques de démontrer que l'ensemble des procédés et des méthodes utilisées pour l'élaboration d'un produit de santé conduit effectivement aux résultats attendus et ceci par la validation qui est un élément crucial du cycle de vie d'une méthode analytique.

Cette nouvelle approche a pour but d'évaluer la validité des méthodes analytiques quantitative, en utilisant une méthodologie détaillée, en se basant sur l'outil statistique qui permet de déterminer un intervalle de tolérance qui a été transposée en un outil de décision final appelé profil d'exactitude.

Ce profil permet de garantir qu'une proportion définie des futurs résultats qui seront fournis par la méthode lors de son utilisation en routine sera bien incluse dans des limites d'acceptation fixées à priori en fonction des besoins des utilisateurs. De cette manière, l'objectif de la validation est parfaitement cohérent avec celui de toute méthode quantitative : obtenir des résultats exacts.

Les résultats expérimentaux montrent que les conditions décrites par SFSTP 2006 ont satisfait les exigences et performances spécifiques dans cette approche harmonisée ; ce qui atteste de la validité de la méthode utilisée et son aptitude à être appliquée en routine par les laboratoires de contrôle qualité pour le dosage de Furosémide dans des comprimés dosés à 40 mg

Perspectives

PERSPECTIVES

Après avoir réalisé ce mémoire de fin d'étude, on suggère comme perspectives :

- L'utilisation de la méthode de dosage que nous avons optimisé au cours de ce mémoire, plus avantageuse, moins dangereuse pour la santé.
- L'étude de la sécabilité du furosémide afin de s'assurer de l'uniformité de masse et de teneur
- Dosage et suivi thérapeutique du furosémide dans le sérum des patients qui l'utilisent.
- Dosage de l'azotémie dans le sérum des patients qui sont soumis au furosémide

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1]:Pharmacopée européenne 6^{ème} édition

[2] : British pharmacopée

[3] : disponible sur le site internet :

<https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Furosemide.html> consulté le 01/07/2019

[4] : MONOGRAPHIE DE PRODUIT.Pr FUROSEMIDE (furosémide) comprimés de 20 mg, 40 mg et 80 mg, diurétique .SanisHealth Inc.333 Champlain Street, Suite 102 Dieppe, New Brunswick E1A 1P2 .5 /03/ 2015.

[5] :VIDAL « Furosémide 40 mg » version électronique

[6] : Collège National de la Pharmacologie Médicale. Disponible sur site internet :

<https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/diuretiques-de-l-anse> consulté le 23/05/2019

[7] : Pr. Philippe Lechat Service de pharmacologie. Pharmacologie Niveau DCEM1. Université Pierre et Marie Curie faculté de médecine 2006 – 2007.

[8]:, Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Commission SFSTP « Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches partie 1 (2006)

[9]:Feinberg. M -LABO-STAT - Guide de validation des méthodes d'analyse; Lavoisier Edition Tec & Doc 2009

[10]: Max feinberg, michel laurentie,annie guerin ; validation des methodes d analyse quantitative par le profil d'exactitude 2010

[11] : Isabelle Pinguet . Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie

[12]:Note for guidance on validation of analytical procesures : text and methodology. ICH Q₂ (R1)

[13] :Michel Laurentic ,groupe de travail “ GT Val 2” . Guide de validation des méthodes d'analyses. ANSES

[14] :Commission SFSTP, Ph. Hubert, J.J. Nguyen-Huu B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. « Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches partie II statistiques (2006)

[15] : Isabelle Pinguet .Validation analytique : application de la procédure SFSTP 2003-2006 au domaine de la phytothérapie

[16] : Rozet E., Improvement of the predictive character of test results issued from analytical methods life cycle, Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Pharmaceutiques, Université de Liège, 2007-2008

[17] : Bouabidi A. Thèse Doctorat en Sciences Pharmaceutiques .Etude Critique des Différentes Approche de Validation des méthodes Analytique .Faculté des Sciences Ben M'Sik Casablanca .Faculté de Médecine Département Pharmacie Université de Liège ; 2013.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[18]: **V.Grenouilleau**, Modification galéniques des formes orales sèches, diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Bordeaux 2 UFR des sciences pharmaceutiques, 2014, pp13-16..

[19] **D.Wiem**, Etude des interactions physicochimiques des bétabloquants avec les excipients, Diplôme National d'Ingénieur en Sciences Appliquées et en Technologie, Université de Carthage, 2013, pp15

[20] Myriam VO. Les comprimés, une forme d'avenir ? [Thèse pour obtenir le diplôme de docteur en pharmacie]. Université de Lorraine, faculté de pharmacie ; 25 sept 2015.

[21]. KétsiaYekpe. Relier les attributs de matériaux et les paramètres de procédés de fabrication à un test de contrôle qualité, une application du concept quality by design [thèse]. Université de Montpellier 1 ; université de Sherbrooke ; 22 juillet 2014.

[22] l'essentiel sur les comprimés

[www.alainrusenholtz.com/content/uploads/2013/10/comprim%25C3%](http://www.alainrusenholtz.com/content/uploads/2013/10/comprim%25C3%20essentiel.pdf) consulté le 2/05/2019

[23] : KétsiaYekpe. Relier les attributs de matériaux et les paramètres de procédés de fabrication à un test de contrôle qualité, une application du concept quality by design [thèse]. Université de Montpellier 1 ; université de Sherbrooke ; 22 juillet 2014.

[24]: Pharmacopée européenne. Edition 8

[25]: A. Le Hir, J.-C. Chaumeil, D. Brossard. Abrégé de Pharmacie galénique. Bonne Pratique de Fabrication de médicaments. Préface de Pr. M.-M. Janot 9^{ème} édition.

Annexes

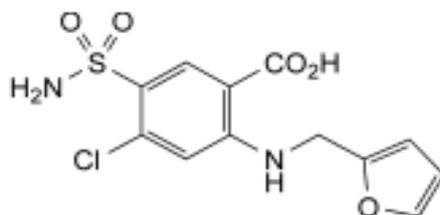
ANNEXE I : monographie du furosémide

01/2008:0391

Corrigé 6.0

FUROSEMIDE

Furosemidum



C₁₂H₁₁ClN₂O₅S Mr 330,7

[54-31-9]

1. DÉFINITION

Acide 4-chloro-2-[(furan-2-ylméthyl)amino]-5sulfamoylbenzoïque.

Teneur : 98,5 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

2. CARACTÈRES

Aspect : poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.

Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans l'acétone, assez soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène. Le furosémide se dissout dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins.

F : environ 210 °C, avec décomposition.

3. IDENTIFICATION

Première identification : B.

Seconde identification : A, C.

ANNEXE I : monographie du furosémide

3.7.1.1.1 Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (2.2.25).

Solution à examiner. Dissolvez 50 mg de furosémide dans une solution d'hydroxyde de sodium R à 4 g/l et complétez à 100 ml avec la même solution. Prélevez 1 ml de cette solution et complétez à 100 ml avec une solution d'hydroxyde de sodium R à 4 g/l.

Région spectrale : 220-350 nm.

Maximums d'absorption : à 228 nm, 270 nm et 333 nm.

Rapport d'absorbance : $A_{270} / A_{228} = 0,52$ à $0,57$.

3.7.1.1.2 Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (2.2.24).

Comparaison : furosémide SCR.

3.7.1.1.3 Dissolvez environ 25 mg de furosémide dans 10 ml d'éthanol à 96 pour cent R.

A 5 ml de cette solution, ajoutez 10 ml d'eau R. A 0,2 ml de solution, ajoutez 10 ml d'acide chlorhydrique dilué R et chauffez à reflux pendant 15 min. Laissez refroidir. Ajoutez 18 ml d'hydroxyde de sodium 1 M et 1 ml d'une solution de nitrite de sodium R à 5 g/l. Laissez reposer pendant 3 min. Ajoutez 2 ml d'une solution d'acide sulfamique R à 25 g/l et mélangez. Ajoutez 1 ml d'une solution de dichlorhydrate de naphtyléthylènediamine R à 5 g/l. Il se développe une coloration rouge-violet.

9. ESSAI

Substances apparentées. Chromatographie liquide (2.2.29).

Préparez les solutions immédiatement avant l'emploi et protégez-les de la lumière.

Solution à examiner. Dissolvez 50,0 mg de furosémide dans la phase mobile et complétez à 50,0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (a). Dissolvez 2,0 mg d'impureté A de furosémide SCR dans la phase mobile et complétez à 2,0 ml avec la phase mobile.

ANNEXE I : monographie du furosémide

Solution témoin (b). Prélevez 1,0 ml de solution à examiner et 1,0 ml de solution témoin (a) et complétez à 20,0 ml avec la phase mobile. Prélevez 1,0 ml de cette solution et complétez à 20,0 ml avec la phase mobile.

Colonne :

— dimensions : $l = 0,25$ m, $\varnothing = 4,6$ mm,

— phase stationnaire : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5 μm).

Phase mobile : dissolvez 0,2 g de phosphate monopotassique R et 0,25 g de cétrimide R dans 70 ml d'eau R ; ajustez à pH 7,0 avec de l'ammoniaque R et ajoutez 30 ml de propanol R.

Débit : 1 ml/min.

Détection : spectrophotomètre à 238 nm.

Injection : 20 μl de solution à examiner et de solution témoin (b).

Enregistrement : 3 fois le temps de rétention du furosémide.

Conformité du système : solution témoin (b) :

— résolution : au minimum 4 entre les pics dus à l'impureté A (1er pic) et au furosémide (2e pic).

Limites:

— impuretés A, B, C, D, E: pour chaque impureté, au maximum la surface du pic dû à l'impureté A dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,25 pour cent),

— total : au maximum 2 fois la surface du pic dû à l'impureté A dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,5 pour cent),

— limite d'exclusion : 0,1 fois la surface du pic dû à l'impureté A dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) (0,025 pour cent).

Chlorures (2.4.4) : au maximum 200 ppm.

A 0,5 g de furosémide, ajoutez un mélange de 0,2 ml d'acide nitrique R et de 30 ml d'eau R. Agitez pendant 5 min. Laissez reposer pendant 15 min, puis filtrez.

Sulfates (2.4.13) : au maximum 300 ppm.

ANNEXE I : monographie du furosémide

A 1,0 g de furosémide, ajoutez un mélange de 0,2 ml d'acide acétique R et de 30 ml d'eau distillée R. Agitez pendant 5 min. Laissez reposer pendant 15 min, puis filtrez.

Métaux lourds (2.4.8) : au maximum 20 ppm. 1,0 g de furosémide satisfait à l'essai C. Préparez la solution témoin avec 2 ml de solution à 10 ppm de plomb (Pb) R.

Perte à la dessiccation (2.2.32) : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de furosémide. Cendres sulfuriques (2.4.14) : au maximum 0,1 pour cent, déterminé sur 1,0 g de furosémide.

10. DOSAGE

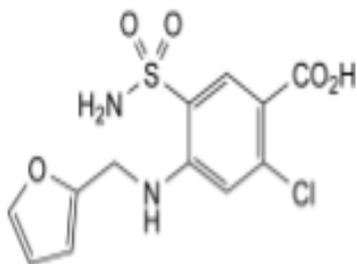
Dissolvez 0,250 g de furosémide dans 20 ml de diméthylformamide R. Titrez par l'hydroxyde de sodium 0,1 M en présence de 0,2 ml de solution de bleu de bromothymol R2. Effectuez un titrage à blanc. 1 ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M correspond à 33,07 mg de $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$

11. CONSERVATION

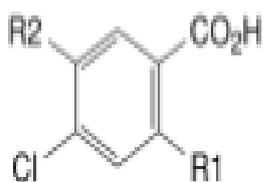
A l'abri de la lumière.

12. IMPURETÉS

Spécifiez les impuretés : A, B, C, D, E.



A. acide 2-chloro-4-[(furan-2-ylméthyl)amino]-5sulfamoylbenzoïque,

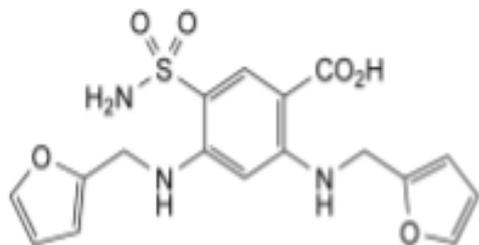


B. R₁ = Cl, R₂ = SO₂NH₂ : acide 2,4-dichloro-5sulfamoylbenzoïque,

ANNEXE I : monographie du furoséide

C. R1 = NH₂, R2 = SO₂-NH₂ : acide 2-amino-4-chloro-5-sulfamoylbenzoïque,

E. R1 = Cl, R2 = H : acide 2,4-dichlorobenzoïque,



D. acide 2,4-bis[(furan-2-ylméthyl)amino]-5-sulfamoylbenzoïque.

ANNEXE II : table de Student

Table de Student

k	γ										
	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.0025	0.0010	0.0005
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.767
24	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.707
27	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
50	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	2.937	3.261	3.496
60	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
80	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	2.887	3.195	3.416
100	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	2.871	3.174	3.390
120	0.677	0.845	1.041	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
∞	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

ANNEXE III : Calcul des indices pour le tri des modèles d'étalonnage

1. Indice d'intervalle de dosage

L'intervalle de dosage (ID) est l'intervalle à l'intérieur duquel la méthode est valide. Il est obtenu en calculant la différence entre la borne supérieure et inférieure des limites de quantification. L'indice d'intervalle de dosage est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle [0,1].

L'indice prend la valeur 1 si la procédure d'analyse est apte à doser sur la totalité de l'intervalle envisagé (concentration minimale et maximales introduites). Il est calculé selon la formule :

$$D(\text{ID}) = \frac{\text{ID}}{C_{\max} - C_{\min}}$$

Où C_{\max} et C_{\min} sont la plus grande et la plus petite concentration introduite.

Remarque : si un seul niveau de concentration est introduit, l'indice d'intervalle de dosage est fixé à 0 ou 1.

2. Indice de fidélité

L'aire utilisée pour le calcul de l'indice de fidélité est l'aire, à l'intérieur des limites de quantification, entre la limite inférieure et supérieure du profil d'exactitude. Cette aire est calculée par la règle de trapèzes. L'indice de fidélité est sans dimension et varie dans l'intervalle [0,1]. Plus cet indice est proche de 1, plus la méthode est fidèle. Il est calculé selon la formule :

$$D(\text{aire}) = \begin{cases} \frac{2\lambda(C_{\max} - C_{\min}) - \text{aire}}{2\lambda(C_{\max} - C_{\min})} & \text{Si aire} < 2\lambda(C_{\max} - C_{\min}) \\ 0 & \text{Si non} \end{cases}$$

ANNEXE III : Calcul des indices pour le tri des modèles d'étalonnage

Où λ est la limite d'acceptation et C_{\max} , C_{\min} sont les concentrations maximale et minimale.

3. Indice de justesse

La somme du carré des biais (SCB) est calculée en sommant le carré des biais estimés à chaque niveau de concentration. L'indice de justesse est un nombre sans dimension variant dans l'intervalle $[0,1]$ où 1 est l'optimum et signifie qu'il n'y a pas de biais pour tous les niveaux de concentrations observés. L'indice est calculé de la façon suivante :

$$D(\text{SCB}) = \begin{cases} -\frac{\text{SCB}}{m\lambda^2} & \text{Si } \text{SCB} \leq m\lambda^2 \\ 0 & \text{Si non} \end{cases}$$

Où λ est la limite d'acceptation de la méthode, et m est le nombre de niveau de concentration.

4. Indice d'exactitude

Ces 3 indices sont compilés dans l'indice d'exactitude qui correspond à la moyenne géométrique D^* des indices respectifs. L'indice d'exactitude varie de 0 à 1. Plus l'indice est proche de 1 meilleure est la méthode. Ce chiffre sans dimension est seulement utilisé pour comparer les différents modèles d'étalonnage et non pour comparer les procédures analytiques. L'indice est calculé de la façon suivante :

$$D^* = \sqrt[3]{D(\text{aire}) \times D(\text{ID}) \times D(\text{SCB})}$$

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance

HPLC

La chromatographie est un ensemble de procédés applicables à des mélanges moléculaires, ioniques, matériaux organiques, inorganiques et biologiques, en vue de leur identification et de leur quantification, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile. La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression P plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique.

1. Principe

HPLC utilise une phase mobile (liquide) contenant un échantillon constitué d'un mélange de solutés à séparer, ce mélange de molécules est introduit dans cette phase qui vont interagir plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique

La phase mobile parcourt le système chromatographique sous haute pression. Le mélange à séparer sera dilué dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne et ceci après qu'il soit injecté à l'entrée de cette dernière. Suite à un phénomène appelé rétention, il résulte que les constituants du mélange injectés se déplacent tous plus vite que la phase mobile et que leur vitesse de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Afin d'obtenir un tracé appelé chromatogramme un détecteur couplé à un enregistreur sont placés à la sortie de la colonne.

Le temps de rétention qui est le temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté caractérise qualitativement une substance et ceci dans des conditions chromatographiques données

L'amplitude de chaque pic ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté

2. Conception général d'un appareil de l'HPLC

Pour assurer le bon fonctionnement de la chromatographie liquide haute performance, il faut qu'elle se dispose de plusieurs parties principales (figure 07).

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance **HPLC**

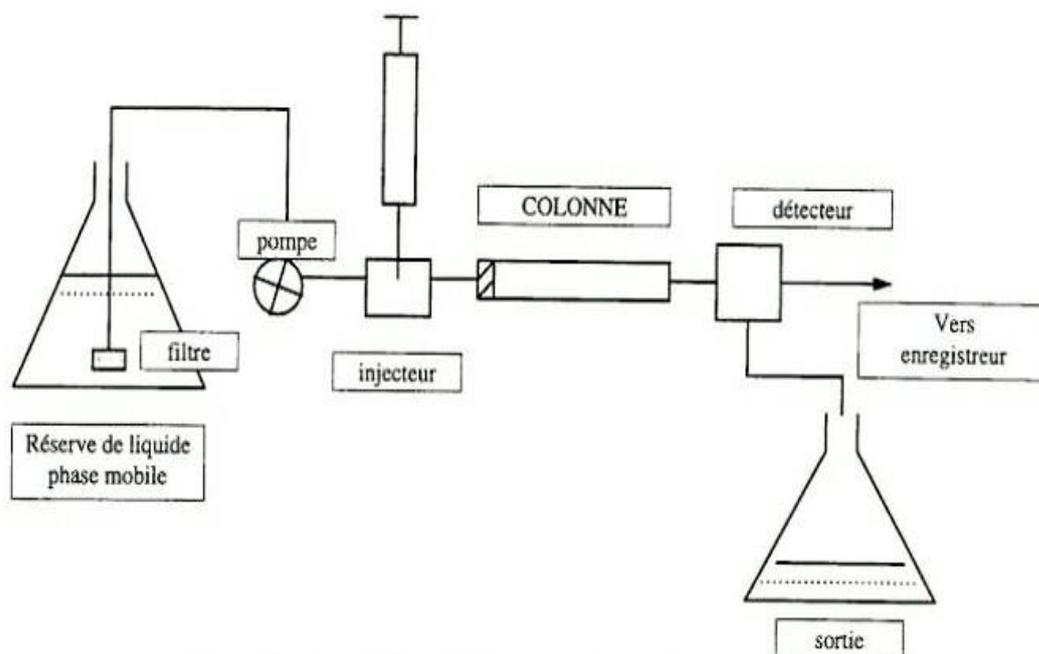


Figure : Appareillage de l'HPLC

2.1. Réservoir de la phase mobile (éluant) :

Les appareils HPLC sont équipés d'un ou plusieurs réservoirs qui vont contenir les solvants, ils sont soit en acier inoxydable résistant à la corrosion, soit en verre.

Il peut y'avoir des perturbations lors de la détection, séparation, ou gêne le bon fonctionnement des pompes et des détecteurs ceci suite à la présence de gaz ambiants comme l'oxygène qui peuvent être dissouts dans les solvants et former des bulls dans la colonne, et des poussières en suspension.

Afin d'éliminer ces perturbations, il est souhaitable de dégazer et filtrer les solvants

Le dégazage peut s'effectuer par pompage sous vide, ultrasons , par chauffage et agitation , ou réaction catalytique qui transforme l'oxygène en formaldéhyde ou acide formique en présence de méthanol , ou encore par barbotage d'hélium qui permet de retenir environ 85% d'oxygène en 10minutes , les solvants sont exempts d'hélium après barbotage du fait de sa faible solubilité dans les solvants ordinaires d'où son intérêt .Pour éviter la redissolution des gaz un barbotage constant d'hélium peut être effectué.

2.2. Système de pompage

Tout appareil HPLC doit contenir au minimum une pompe qui va délivrer en continu la phase mobile et forcer son passage à travers la colonne et provoquer un écoulement compatible avec la séparation chromatographique

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

Les pompes requises doivent répondre à des exigences rigoureuses :

- ✓ Atteindre des pressions élevées : -200bars (20000KPa) ou plus
- ✓ Être exempt d'impulsions
- ✓ Imposer des débits reproductibles de 0,1 à 10ml/minutes
- ✓ Résister à la corrosion et aux solvants
- ✓ Permettre de délivrer un éluant de composition fixe en mode isocratique ou de composition variable pour travailler en gradient d'élution

Elles permettent de travailler :

- ✓ En mode isocratique : c'est à dire l'élution est effectuée avec un seul solvant ou un mélange de composition fixe et constante.
- ✓ En mode gradient : élution avec programmation des solvants de polarité différente

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques ml à plusieurs ml/minutes.

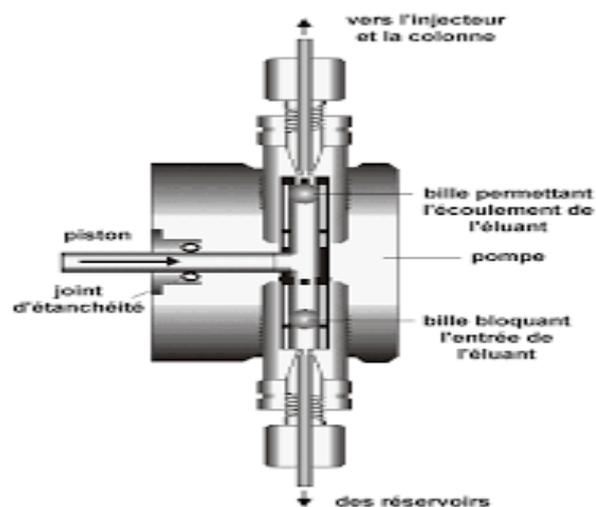


Figure : Exemple d'une pompe HPLC

2.3. Système d'injection

En HPLC, on injecte souvent l'échantillon à l'aide d'une seringue à travers un septum en élastomère (à dépôt direct), toutefois cette procédure n'est pas très reproductible et reste limitée aux pressions inférieures à environ 100bars.

La méthode d'introduction de loin la plus utilisée emploie des boucles d'échantillonnage

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

Ces dispositifs font généralement partie intégrante de l'appareillage de HPLC moderne qui possède des boucles interchangeables permettant de choisir des volumes d'échantillons compris entre 5 et 500 μ l.

Avec ce système la reproductibilité des volumes injectés est de quelques dixièmes de pour cent.

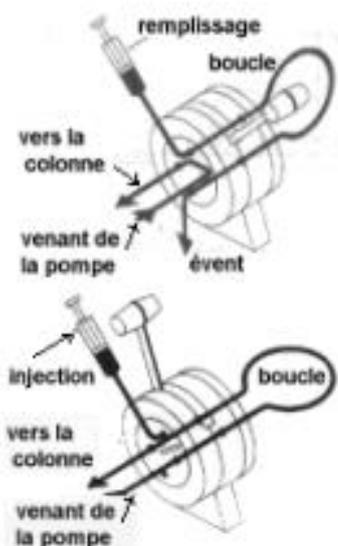


Figure: Remplissage d'une boucle d'injection

2.4. Colonnes

La colonne est l'endroit où s'effectue la séparation des composés, elle est usuellement en acier inoxydable quoiqu'on utilise parfois des tubes de verre à paroi épaisse dans le domaine de basses pressions inférieur à 40 bars. Elle a une longueur qui varie de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6mm, ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μ m.

On place souvent une colonne de protection en amont de la colonne analytique afin d'augmenter la durée de vie en éliminant les poussières et les contaminants contenus dans les solvants et d'éviter ainsi l'obstruction et la détérioration des colonnes.

2.5. Phase stationnaire

2.5.1. Phase normale

La phase normale est constituée de gel de silice, cette phase est très polaire et nécessite donc un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution ce sont les composés polaires qui sont retenus dans la colonne contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance **HPLC**

.L'inconvénient d'une telle phase c'est la détérioration rapide au cours du temps du gel de silice ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations

2.5.2. Phase inverse

Elle est généralement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 à 18 atomes de carbones (C^8 et C^{18}), ce matériau est apolaire, il faut donc utiliser un éluant polaire (ACN, MeOH, H_2O). Dans ce cas ce sont les composés polaires qui seront élués en premier

Contrairement à la phase normale, la qualité de la séparation est maintenue constante et il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps.

2.6.Phase mobile

En fonction de la polarité de la phase stationnaire, on a deux situations :

On utilise une phase mobile peu polaire, si la phase stationnaire est polaire, la chromatographie est dite en phase normale

On choisit une phase mobile polaire, si la phase stationnaire est très peu polaire, c'est la chromatographie en phase inverse.

Avec un éluant polaire, les composés polaires migrent plus vite que les composés apolaires .Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus

Ainsi avec une phase greffée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales, et ces silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité

2.7.Détecteurs

Permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés.

Les principaux caractères d'un détecteur idéal sont :

- ✓ Une sensibilité appropriée, en générale les sensibilités des détecteurs utilisés de nos jours sont comprise entre 10^{-8} et 10^{-15} grammes de soluté
- ✓ Une bonne stabilité et une bonne reproductibilité
- ✓ Une réponse linéaire
- ✓ Un temps de réponse rapide indépendant de la vitesse d'écoulement
- ✓ Une grande fiabilité et facilité d'emploi
- ✓ Une réponse uniforme à tous les solutés ou, au contraire, réponse sélective limitée à une ou plusieurs classes de solutés

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance **HPLC**

- ✓ La préservation de l'intégrité de l'échantillon
- ✓ Le volume du détecteur HPLC devrait être le plus faible possible afin de diminuer l'élargissement des bandes

2.7.1. Détecteur d'absorption dans l'U.V visible

Ces détecteurs mesurent l'absorbance d'une lumière monochromatique du soluté à une longueur d'onde dans le domaine UV-visible [31]. Ils sont les plus utilisés en HPLC.

Cette détection suit la loi de Beer Lambert.

$$A = \epsilon.l.C$$

Avec :

-A : absorbance

- ϵ : le coefficient d'absorption molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$

-l : épaisseur de la solution traversée ou de la cellule en cm

-c : la concentration de la solution en mol/L

Exemple de détecteur à barrette de diodes qu'est un détecteur spectrophotométrique basé sur l'absorption des composés dans le domaine de longueur d'onde appartenant à l'UV/Visible. Il permet d'obtenir des renseignements spectraux pouvant servir à l'identification des composés séparés

2.7.2. Détecteurs d'absorption dans l'infrarouge

Il existe deux types de ces détecteurs, le premier avec un domaine s'étend de 2.5 à 14.5 μm (ou de 4000 à 690 cm^{-1}). Le second type à transformée de Fourier

2.7.3. Détecteurs à indice de réfraction

Le détecteur mesure l'indice de réfraction du liquide sortant de la colonne. C'est un détecteur universel puisque l'indice de réfraction de l'éluant est modifié lorsqu'un composé, quel qu'il soit, sort de la colonne. De plus, il est fiable et indépendant du débit, et il est thermosensible

2.7.4. Détecteurs de fluorescence

Ces détecteurs utilisent le même principe que ceux des fluorimètres ou spectrofluorimètres, en mesurant la fluorescence des solutés suite à des réactions pré ou post

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance

HPLC

colonne. La fluorescence est observée à l'aide d'un détecteur photoélectrique situé à 90 degrés de rayonnement d'excitation

2.7.5. Détecteurs électrochimiques

Leur fonctionnement est basé sur l'ampérométrie, la polarographie, la coulométrie et la mesure de conductivité

2.7.6. Détecteur de spectrométrie de masse

Le couplage HPLC/SM est plus difficile à réaliser qu'avec la CPG car il faut éliminer le solvant d'éluion soit par une évaporation sélective du soluté, ou par l'utilisation des micro-colonnes ($L=10$ cm, $d_{int}=1$ mm) à faible débit (quelque μ l/min) et un volume d'injection voisinage de 1μ L

2.8. Enregistreurs

Les détecteurs sont munis de logiciels appropriés qui permettent d'acquérir et d'enregistrer simultanément sur un ordinateur le chromatogramme à chaque molécule éluee. L'enregistreur reçoit un signal électrique qui sera traité pour tracer un chromatogramme. Parmi ces logiciels on citera à titre d'exemple le logiciel utilisé en CPG le Millennium.

3. Champs d'application de l'HPLC

Vue sa sensibilité et sa facilité d'adaptation, l'HPLC est utilisé plus en analyse quantitative qu'en analyse qualitative. Cette technique est appliquée dans plusieurs domaines, elle permet : [En biochimie, le dosage de l'hémoglobine A1c, les acide aminés, les protéines, les hydrates de carbones, hormones, les acides nucléiques, vitamines etc.

- ✓ En hématologie, le dosage qualitative et quantitative des hémoglobines anormales
 - ✓ En toxicologie, la mise en évidence et le dosage des substances responsable d'une intoxication volontaires ou non, des drogues, des amphétamines, de la méthadone, etc.
 - ✓ En pharmacologie, le dosage de nombreux médicaments pour un suivi thérapeutique.
- L'HPLC a marqué sa place dans tous les secteurs de l'industrie pharmaceutique (R et D, contrôle qualité, validation du nettoyage).

4. Place de l'HPLC dans l'analyse

4.1. Chromatogramme

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

Un chromatogramme est un diagramme résultant d'une chromatographie, montrant l'évolution du signal du détecteur en fonction du temps d'élution.

4.1.1. Notions fondamentales

Le pic chromatographique a une allure gaussienne

- La largeur d'une courbe de Gauss est définie par :
- ✓ $\sigma =$ écarttype = $\frac{1}{2}$ largeur du pic à la hauteur des points d'inflexion, à 60,6% de la hauteur.
- ✓ $\delta = 2,35 \sigma =$ largeur à mi-hauteur
- ✓ $\omega = 4\sigma = 1,7\delta =$ largeur mesurée à 13,5% de la hauteur = largeur à la base du pic
- A: aire du pic
- H: hauteur de pic chromatographique
- RSD : Relative Standard Deviation :

$$\%RSD = 100\sigma/A'$$

Avec :

A' : Moyenne des aires du pic.

4.1.2. Grandeurs de rétention

4.1.2.1 Temps mort t_0 ou t_M

Temps nécessaire à l'éluant non retenu pour qu'il arrive au détecteur.

$$t_M = \frac{L}{v}$$

Avec :

L : la longueur de la colonne.

v : la vitesse de la phase mobile.

4.1.2.2 Temps de rétention t_R (min)

Temps écoulé entre l'injection et le moment où le constituant sort de la colonne et celui correspondant sur le chromatogramme au maximum du pic.

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

4.1.2.3 Temps de rétention réduit ou corrigé t_R'

$$t_R' = t_R - t_M$$

4.1.2.4 Volume de rétention V_R (ml)

C'est le volume de la phase mobile nécessaire pour élué un composé d'un mélange à analyser. Ce volume est caractéristique d'un seul composé dans des conditions opératoires données,

$$V_R = t_R \times D$$

Avec :

D : débit d'écoulement de la phase mobile en ml/min

4.1.2.5 Facteur de rétention K'

Le facteur de rétention K' représente l'affinité d'un composé vis-à-vis de la phase stationnaire

$$K' = \frac{t_R'}{t_M}$$

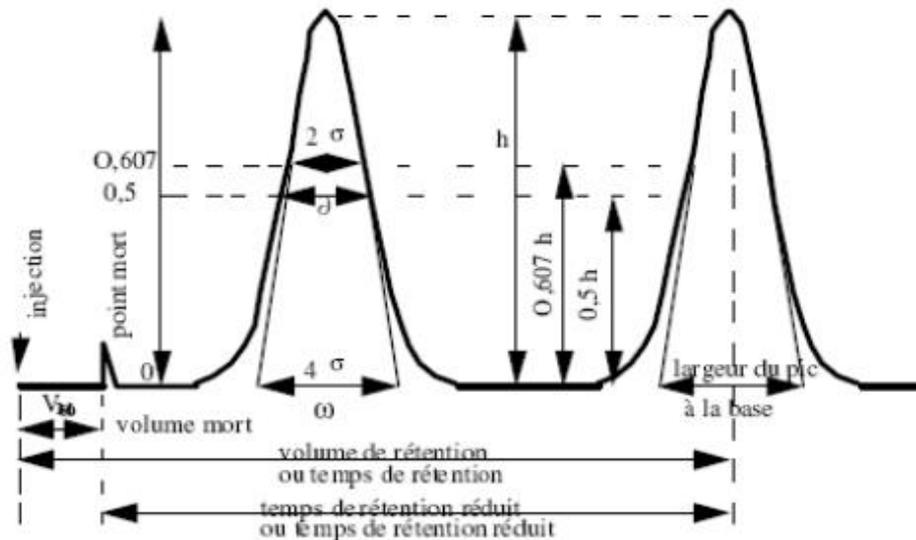


Figure : principaux paramètres d'un chromatogramme

4.2. Analyse qualitative

4.2.1. Notion de Concentration

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

4.2.1.1 Coefficient de partage K

Le coefficient de partage K_s est le rapport entre la concentration C_m de la phase mobile et la concentration C_s de la phase stationnaire. il dépend de :

- L'affinité du soluté avec la phase mobile
- L'affinité du soluté avec la phase stationnaire
- L'affinité de la phase stationnaire avec la phase mobile

$$K_s = \frac{C_s}{C_m}$$

4.2.1.2 Facteur de capacité K'

C'est le rapport de la quantité du soluté dans la phase mobile et la quantité du soluté dans la phase stationnaire, cela se traduit par le rapport entre le temps de rétention de la phase stationnaire et le temps de rétention de la phase mobile

$$K' = \frac{C_s \times V_s}{C_m \times V_m}$$

$$K' = \frac{K \times V_s}{V_m}$$

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

v_s : volume de la phase stationnaire

v_m : volume de la phase mobile ou volume mort

4.2.2. Notion d'efficacité et de performance

Elle se traduit par la finesse des pics. Plus le pic est fin plus la colonne est efficace. Elle dépend du nombre de plateaux théoriques N et la hauteur équivalente à un plateau théorique H ou HEPT

4.2.2.1 Le nombre de plateaux théoriques N

$$N = \frac{16t_r^2}{w^2}$$

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

$$N = \frac{5.54 t_r^2}{\delta^2}$$

t_r : temps de rétention

δ : largeur du pic a mi-hauteur

N est caractéristique d'un système chromatographique

Plus N est grand, plus la colonne est efficace, plus le pic est fin.

4.2.2.2 La hauteur équivalente à un plateau théorique H

$$H = \frac{L}{N}$$

L : longueur de la colonne

N : nombre de plateau théoriques

N' est le nombre de plateaux efficace ou nombre de plateaux théoriques effectifs Neff

$$N' = 16 \left(\frac{t_r - t_m}{w} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_r - t_m}{\delta} \right)^2$$

4.2.3. Qualité de séparation

4.2.3.1 La sélectivité α

Est exprimée par la formule suivante

$$\alpha = \frac{t_{rA}}{t_{rB}}$$

Pour préciser la position relative de deux pics chromatographiques adjacents. Plus α est élevé plus la séparation est facile

$\alpha = 1$: pas de séparation

$\alpha > 1$: séparation

4.2.3.2 Facteur de résolution Rs

ANNEXE IV : chromatographie liquide haute performance HPLC

Est calculé par la formule suivante :

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_1 + w_2}$$

t_r : temps de rétention de chaque pic

w : largeur des pics à la base

Plus R_s est grand, plus la séparation est meilleure

$R_s \leq 0.8$: séparation insuffisante

$R_s \leq 1$: chevauchement des pics

$R_s = 1$: 2% de chevauchement des pics

$R_s \geq 1.5$: bonne séparation

4.3. Analyse quantitative

Il a été prouvé que la surface des pics est proportionnelle à la concentration ou la quantité de l'analyte dosé.

La surface est exprimée par la formule suivante :

$$A = K_c \times C$$

Avec :

A : l'aire du pic

C : concentration du composé injecté

K_c : coefficient de la réponse du détecteur

ANNEXE IV : Chromatogrammes

- Série 1

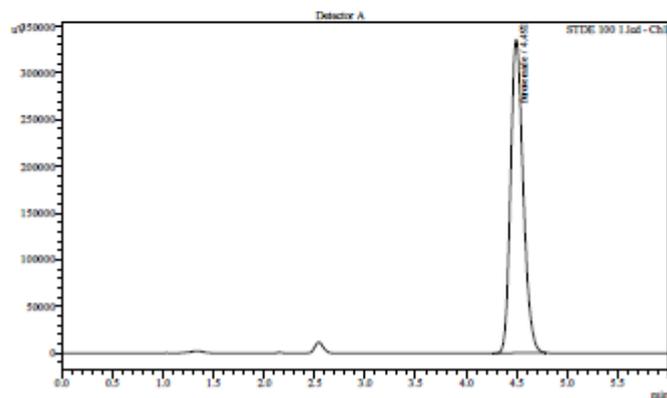
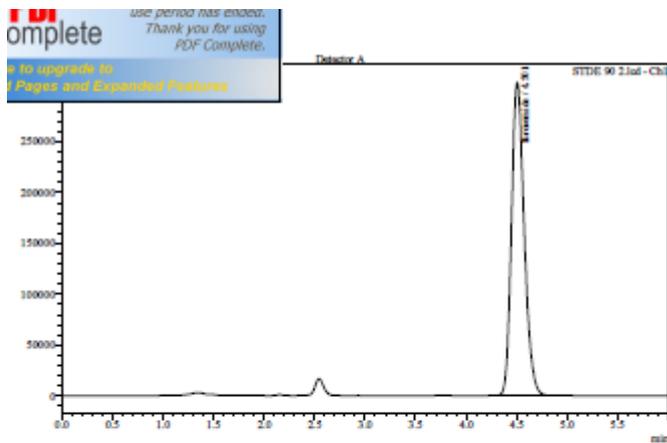
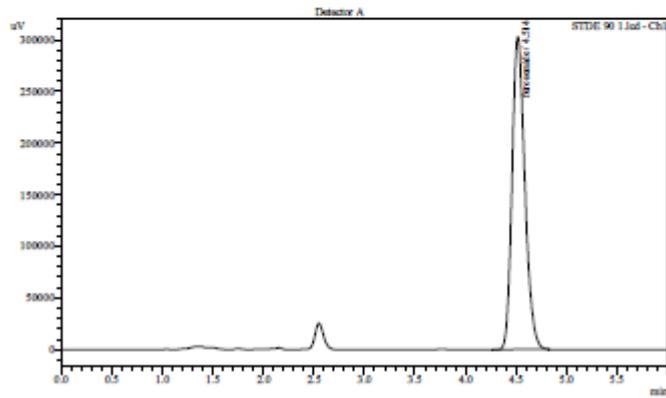
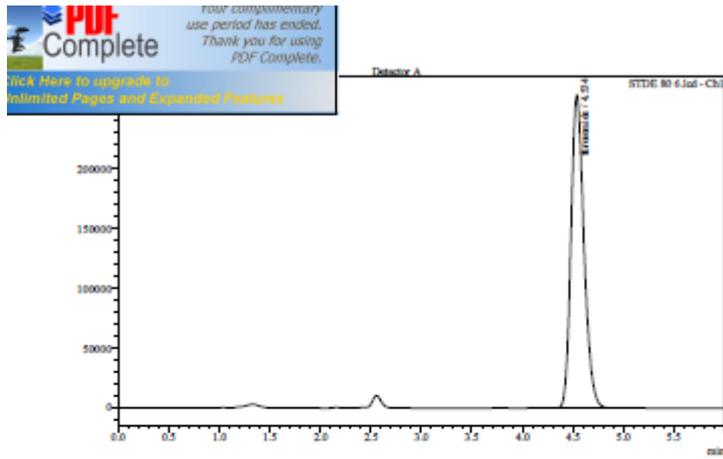
Sample Information

Acquired by : Admin
Sample Name : std 80 1
Sample ID : std 100furosemide 5eme
Tray# : 11
Vail# : 1
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : STDE 80 4.kd
Method Filename : furosemide.lcm
Batch Filename : serie2.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 01/01/2006 02:16:24
Data Processed : 01/01/2006 02:42:44

Summary(Concentration)

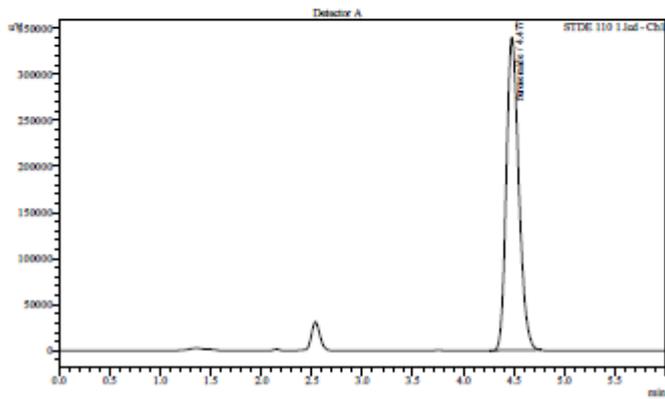
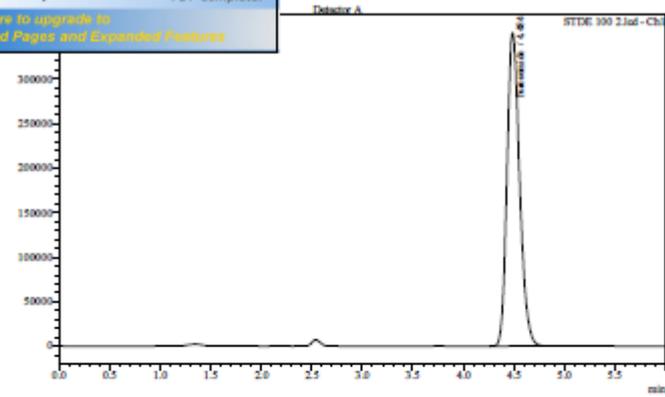
-

ANNEXE IV : Chromatogrammes

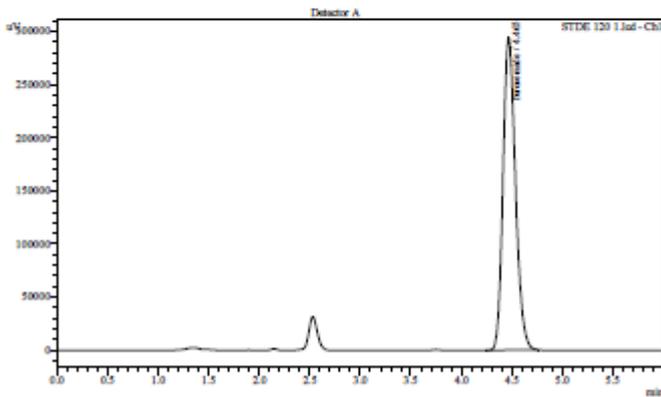
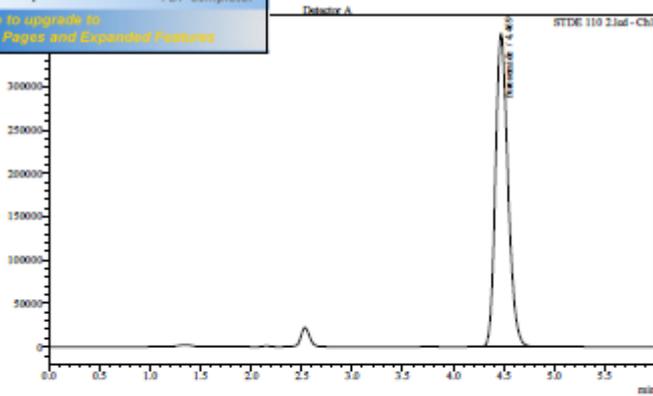


ANNEXE IV : Chromatogrammes

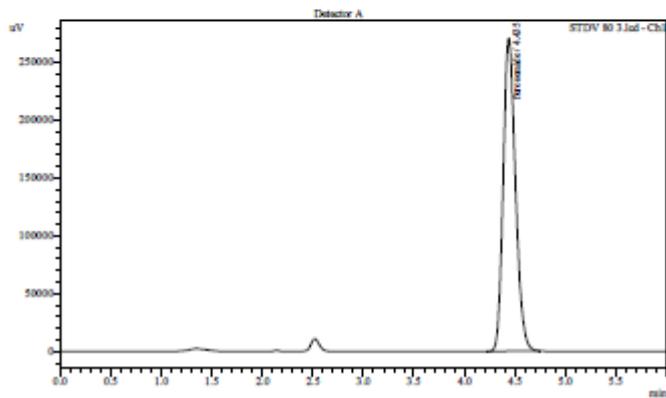
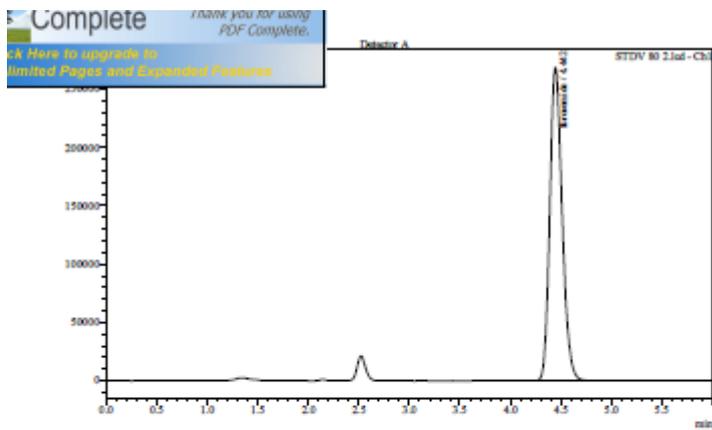
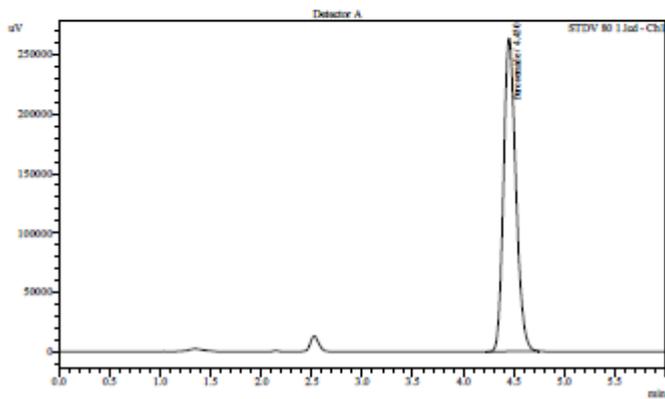
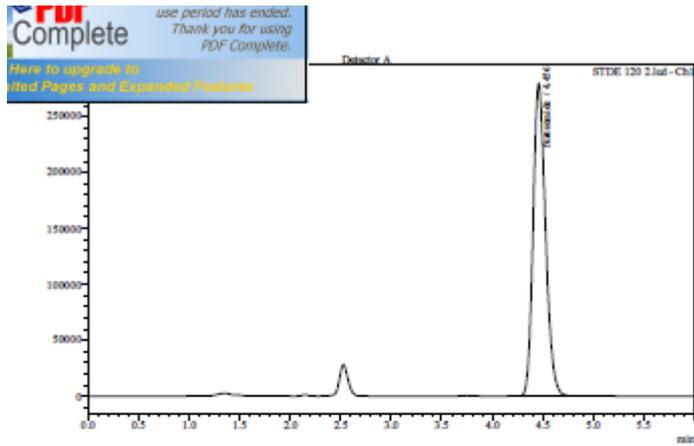
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to limited Pages and Expanded Features



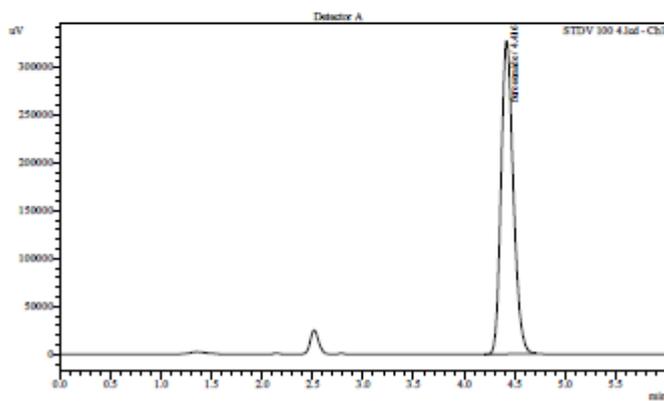
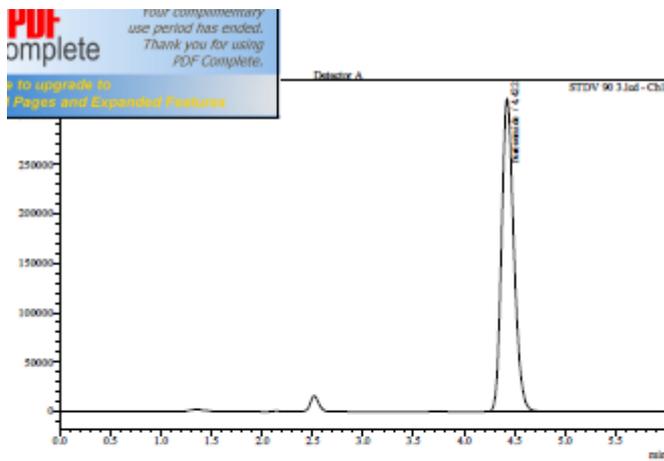
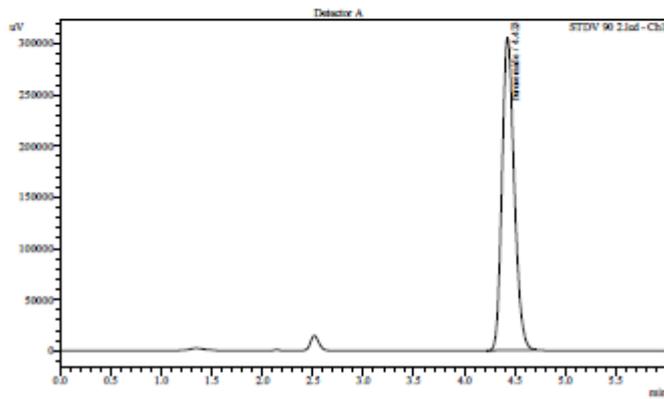
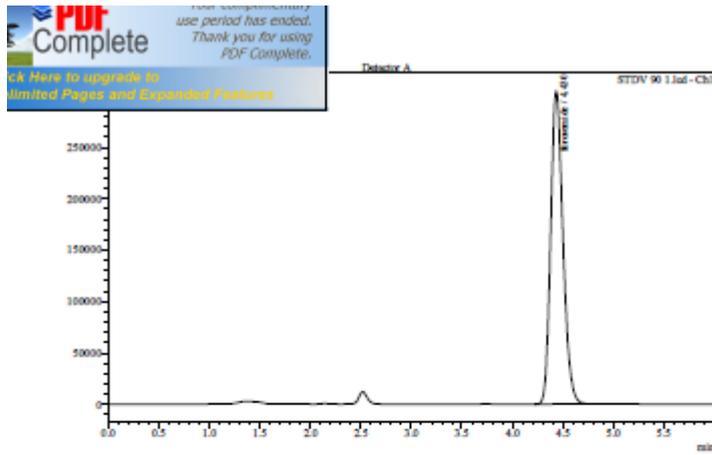
PDF Complete
Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.
Click Here to upgrade to limited Pages and Expanded Features



ANNEXE IV : Chromatogrammes

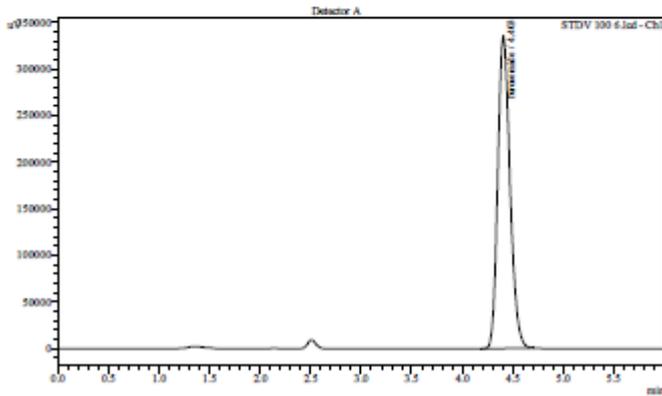
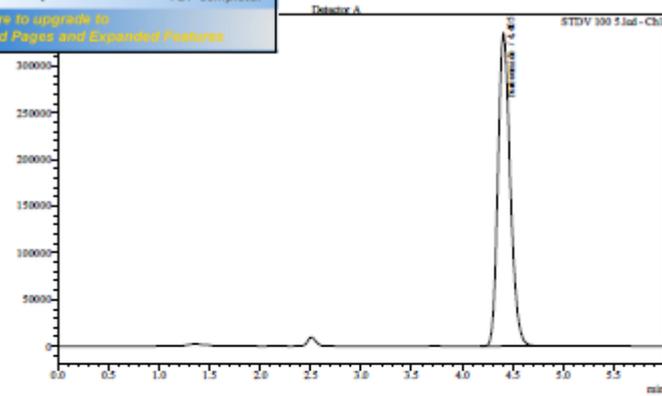


ANNEXE IV : Chromatogrammes

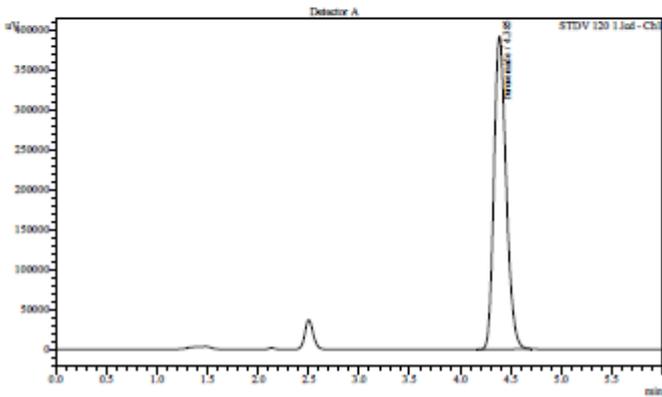
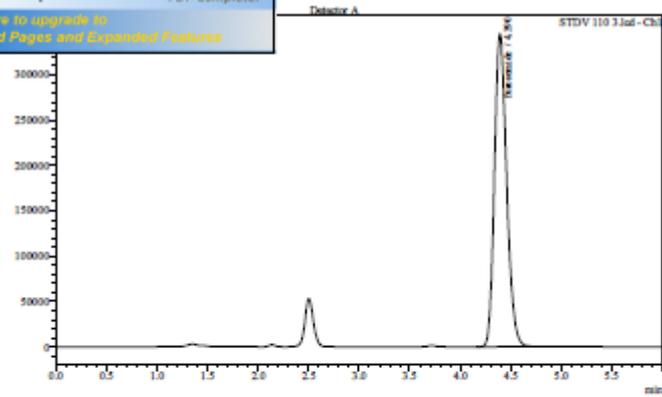


ANNEXE IV : Chromatogrammes

PDF Complete
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.
Click here to upgrade to
PDF Complete and Expanded Features

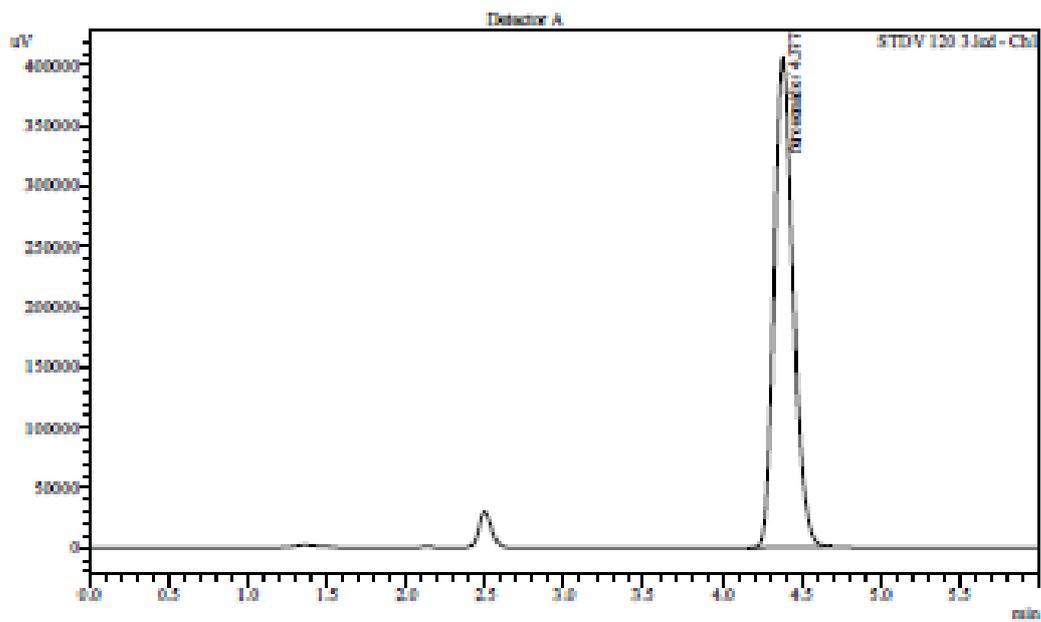
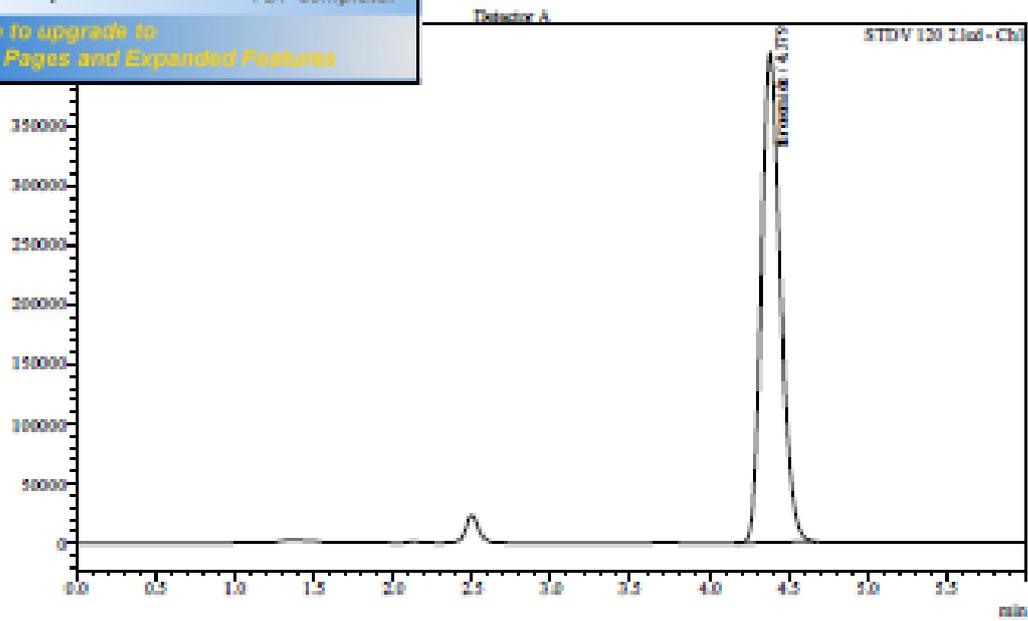


PDF Complete
Thank you for using
PDF Complete.
Click here to upgrade to
PDF Complete and Expanded Features



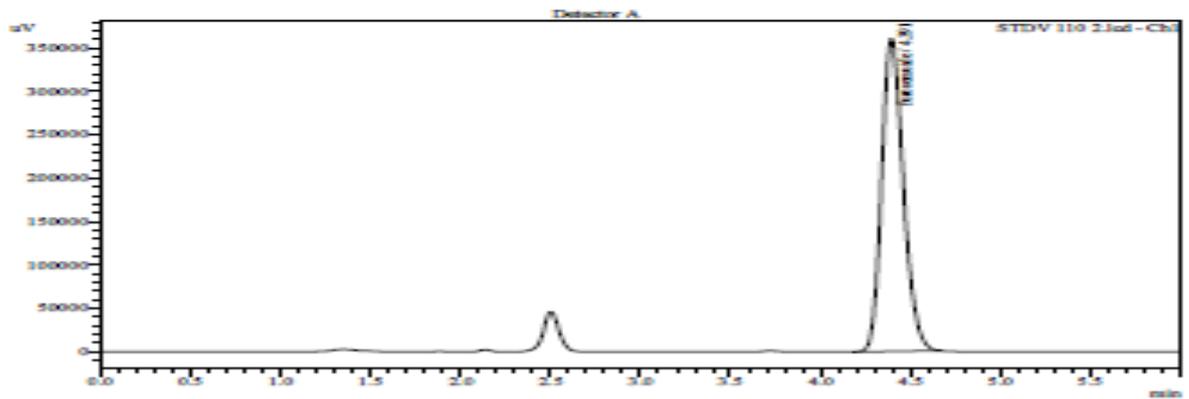
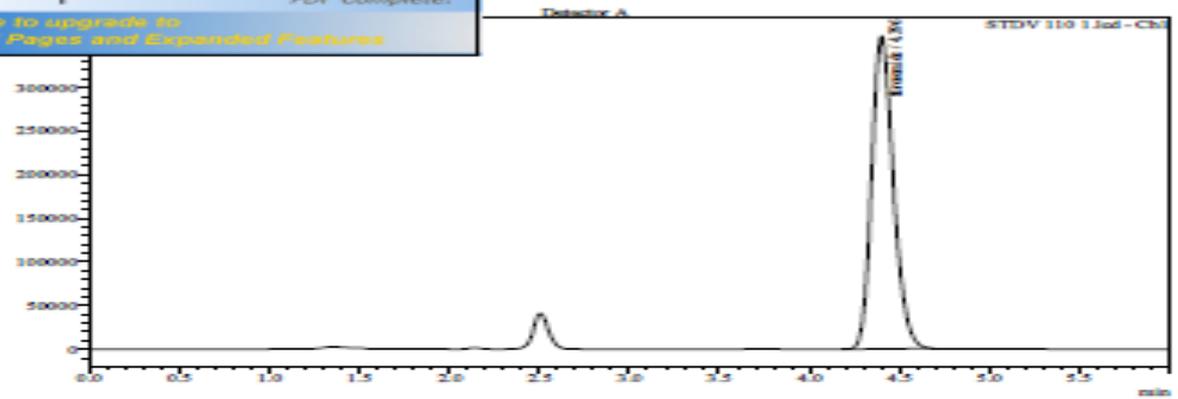
ANNEXE IV : Chromatogrammes

PDF Complete
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.
Click Here to upgrade to
unlimited Pages and Expanded Features



ANNEXE IV : Chromatogrammes

PDF Complete
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.
Click here to upgrade to
unlimited Pages and Expanded Features



ANNEXE IV : Chromatogrammes

<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	furosemide
STDE 80 4.lcd	std 80 1	std 100furosemi	2319830
STDE 80 5.lcd	std 80 1	std 100furosemi	2319830
STDE 80 6.lcd	std 80 2	std 100furosemi	2347658
STDE 90 1.lcd	std 90 1	std 100furosemi	2626012
STDE 90 2.lcd	std 90 2	std 100furosemi	2653268
STDE 100 1.lcd	std 100 1	std 100furosemi	2917113
STDE 100 2.lcd	std 100 2	std 100furosemi	2975071
STDE 110 1.lcd	std 110 1	std 100furosemi	3251221
STDE 110 2.lcd	std 110 2	std 100furosemi	3282910
STDE 120 1.lcd	std 120 1	std 100furosemi	3615040
STDE 120 2.lcd	std 120 2	std 100furosemi	3635672

Title	Sample Name	Sample ID	furosemide
STDV 80 1.lcd	std 80 12	std 100furosemi	2296569
STDV 80 2.lcd	std 80 2	std 100furosemi	2305631
STDV 80 3.lcd	std 80 3	std 100furosemi	2280743
STDV 90 1.lcd	std 90 1	std 100furosemi	2530167
STDV 90 2.lcd	std 90 2	std 100furosemi	2588139
STDV 90 3.lcd	std 90 3	std 100furosemi	2561457
STDV 100 4.lcd	std 100 1	std 100furosemi	2882426
STDV 100 5.lcd	std 100 2	std 100furosemi	2924196
STDV 100 6.lcd	std 100 3	std 100furosemi	2879195
STDV 110 1.lcd	std 110 1	std 100furosemi	3279195
STDV 110 2.lcd	std 110 2	std 100furosemi	3243142
STDV 110 3.lcd	std 110 3	std 100furosemi	3257305
STDV 120 1.lcd	std 120 1	std 100furosemi	3610099
STDV 120 2.lcd	std 120 2	std 100furosemi	3609515
STDV 120 3.lcd	std 120 3	std 100furosemi	3626441
Average			2734411
%RSD			13.250
Maximum			3439453
Minimum			2241207
Standard Deviation			362298

ANNEXE IV : Chromatogrammes

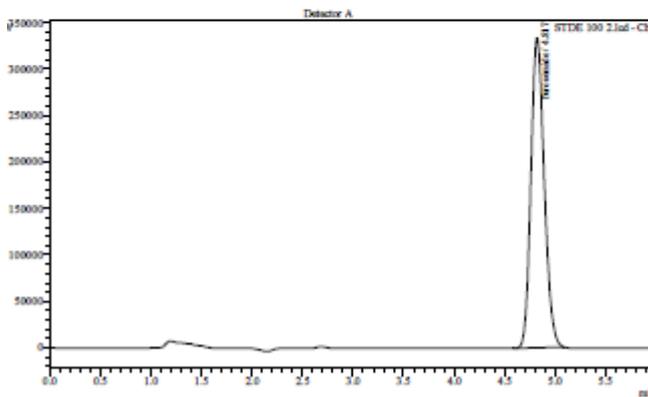
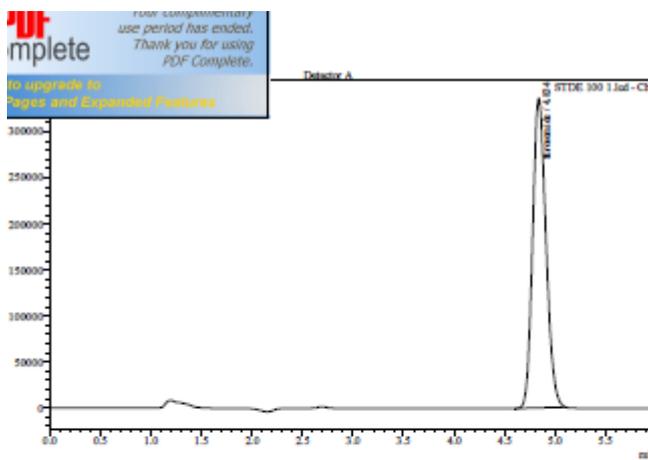
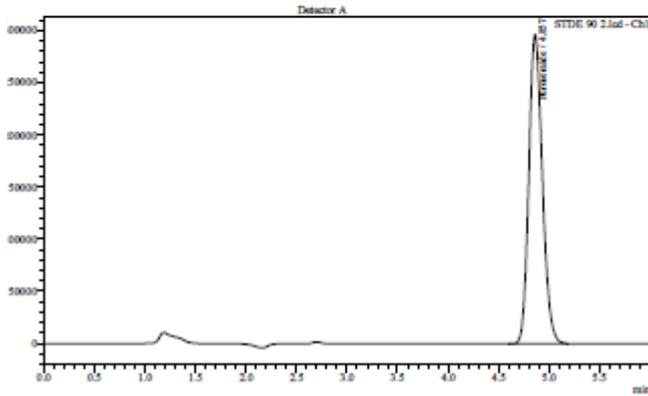
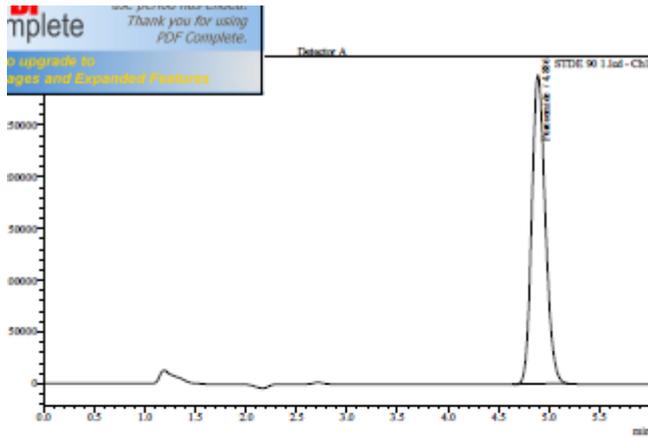
- Série 2

Sample Information

Acquired by : Admin
Sample Name : std 80 1
Sample ID : std 100furosemide 5eme
Tray# : 11
Vail# : 1
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : STDE 80 1.kd
Method Filename : furosemide.lcm
Batch Filename : serie3.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 31/12/2005 23:42:09
Data Processed : 01/01/2006 01:43:50

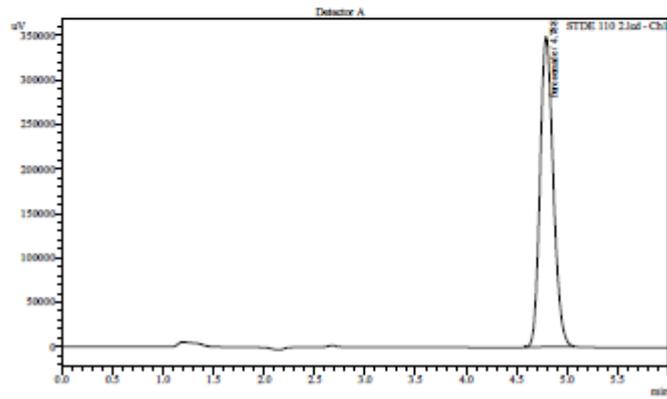
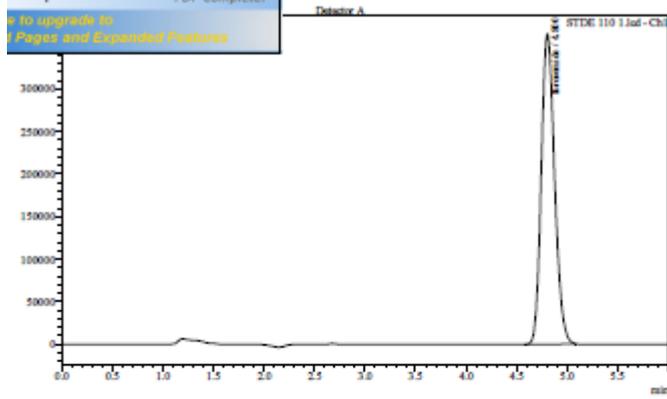
Summary(Concentration)

ANNEXE IV : Chromatogrammes

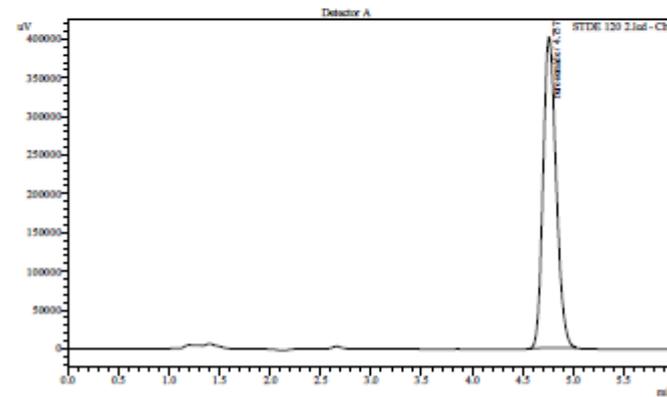
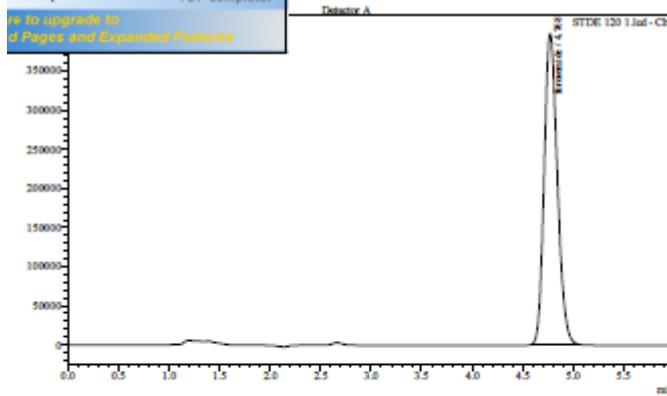


ANNEXE IV : Chromatogrammes

PDF complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
Click here to upgrade to PDF Complete and Expanded Features

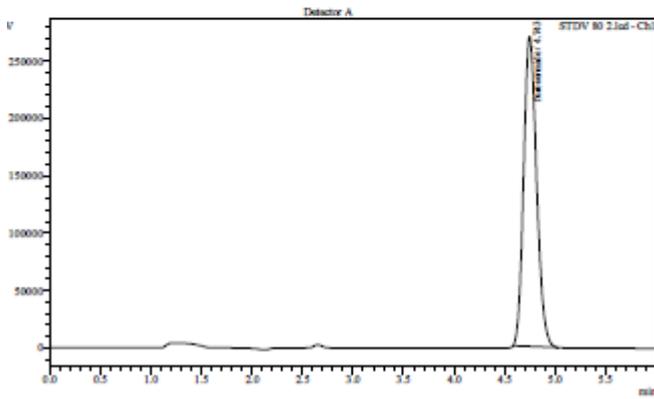
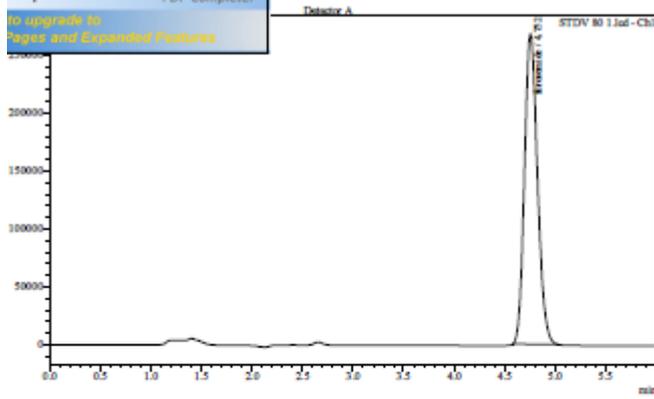


PDF complete
Thank you for using PDF Complete.
Click here to upgrade to PDF Complete and Expanded Features

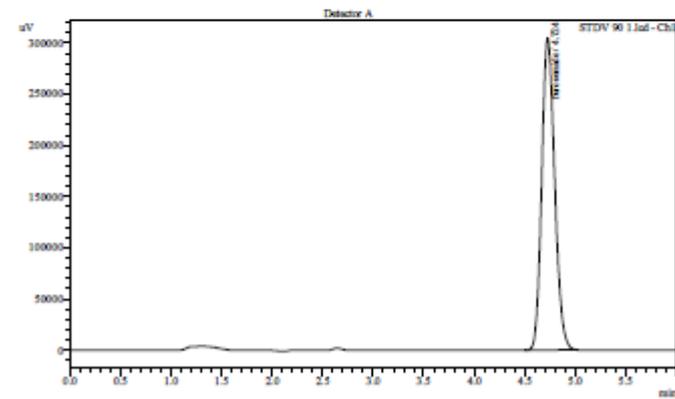
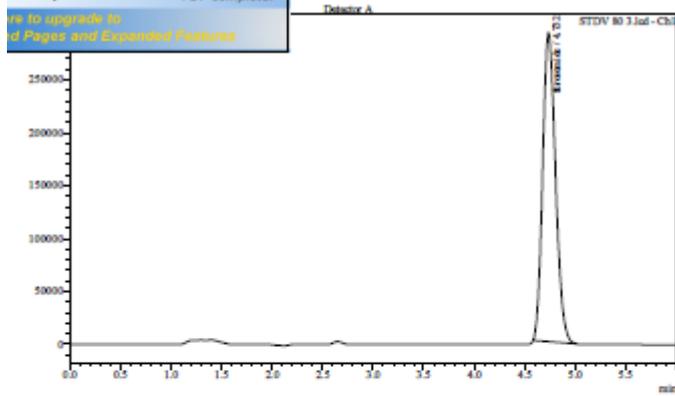


ANNEXE IV : Chromatogrammes

PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
To upgrade to Paid Pages and Expanded Features

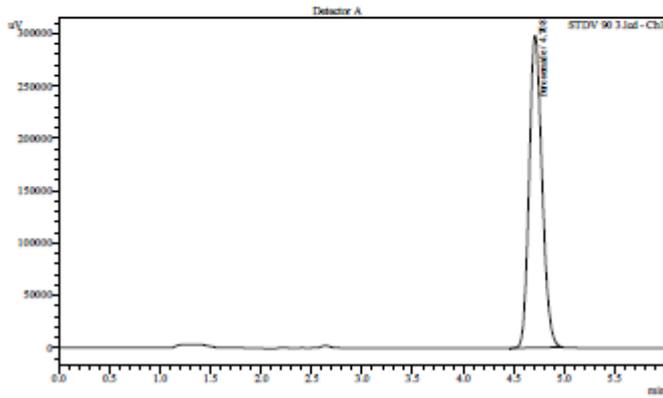
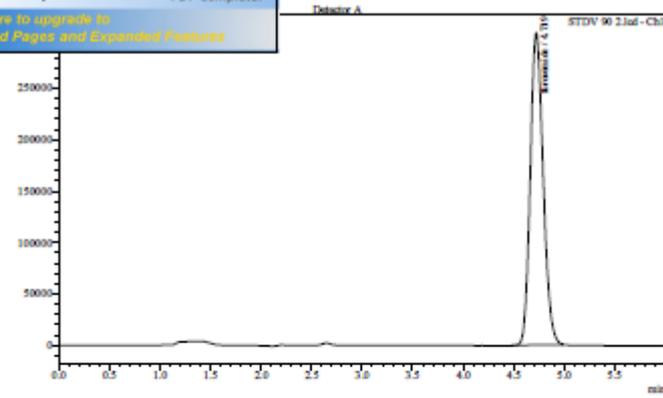


PDF Complete
Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.
To upgrade to Paid Pages and Expanded Features

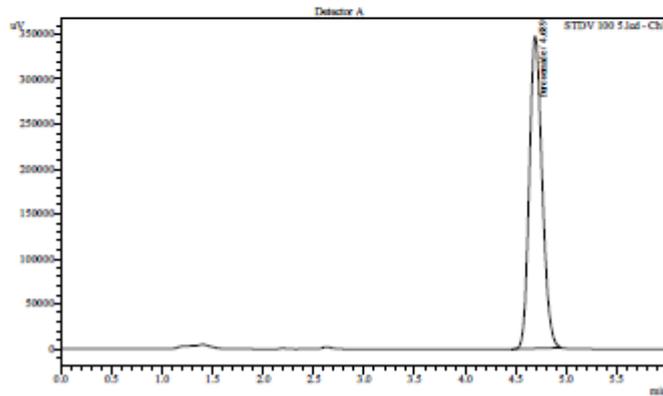
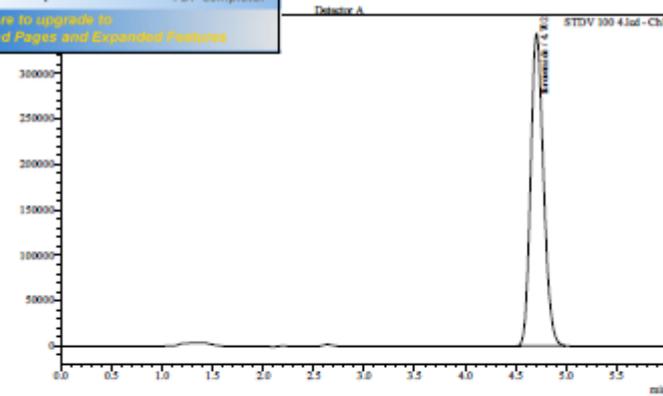


ANNEXE IV : Chromatogrammes

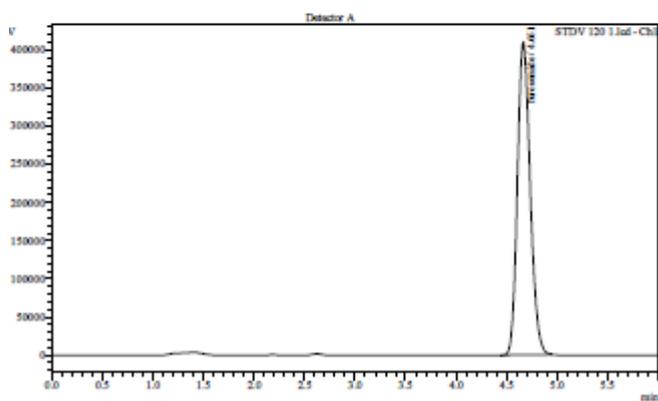
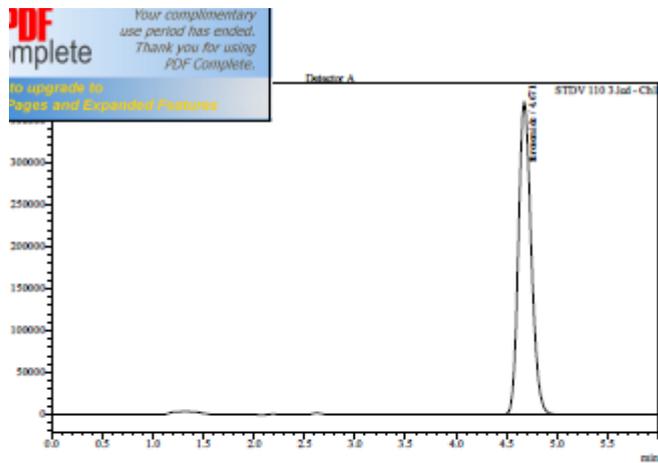
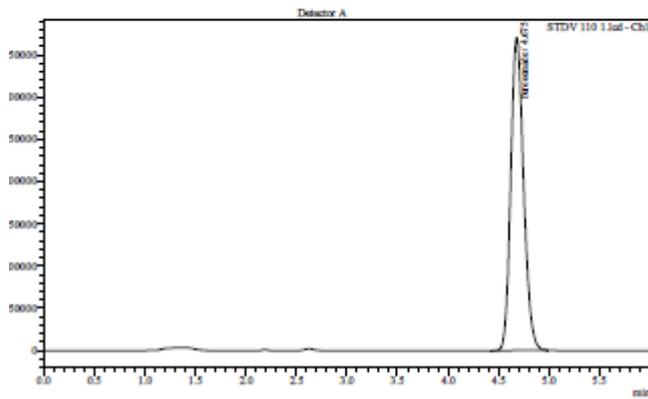
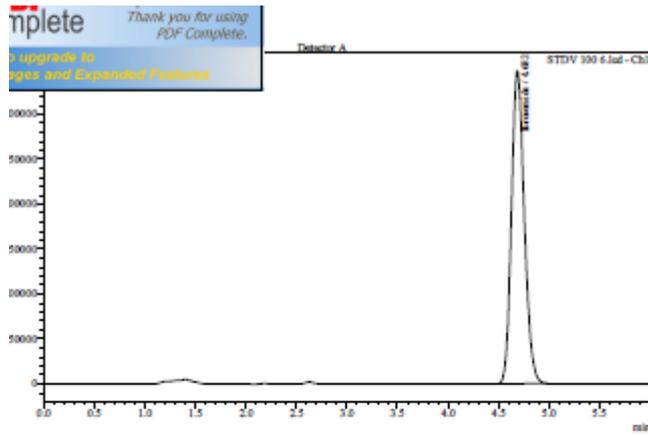
PDF Complete
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.
Click here to upgrade to
PDF Complete and Expanded Features



PDF Complete
Thank you for using
PDF Complete.
Click here to upgrade to
PDF Complete and Expanded Features



ANNEXE IV : Chromatogrammes

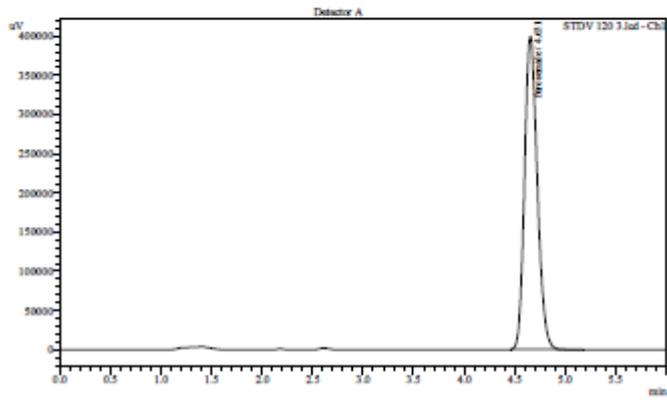
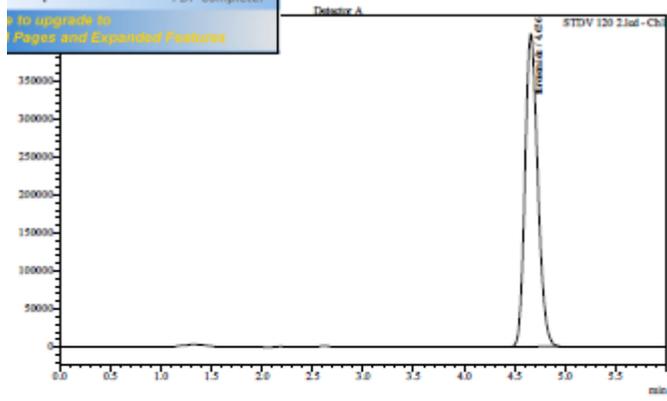


ANNEXE IV : Chromatogrammes

PDF
complete

your complementary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

to upgrade to
Pages and Expanded Features



ANNEXE IV : Chromatogrammes

<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	furosemide
STDE 80 1.lcd	std 80 1	std 100furosemi	2328823
STDE 80 2.lcd	std 80 2	std 100furosemi	2336033
STDE 90 1.lcd	std 90 1	std 100furosemi	2632102
STDE 90 2.lcd	std 90 2	std 100furosemi	2623459
STDE 100 1.lcd	std 100 1	std 100furosemi	2955052
STDE 100 2.lcd	std 100 2	std 100furosemi	2954552
STDE 110 1.lcd	std 110 1	std 100furosemi	3271631
STDE 110 2.lcd	std 110 2	std 100furosemi	3268075
STDE 120 1.lcd	std 120 1	std 100furosemi	3624760
STDE 120 2.lcd	std 120 2	std 100furosemi	3692608
STDV 80 1.lcd	std 80 12	std 100furosemi	2252104

Title	Sample Name	Sample ID	furosemide
STDV 80 2.lcd	std 80 2	std 100furosemi	2284376
STDV 80 3.lcd	std 80 3	std 100furosemi	2296042
STDV 90 1.lcd	std 90 1	std 100furosemi	2580358
STDV 90 2.lcd	std 90 2	std 100furosemi	2593128
STDV 90 3.lcd	std 90 3	std 100furosemi	2574648
STDV 100 4.lcd	std 100 1	std 100furosemi	2969407
STDV 100 5.lcd	std 100 2	std 100furosemi	2938931
STDV 100 6.lcd	std 100 3	std 100furosemi	2934760
STDV 110 1.lcd	std 110 1	std 100furosemi	3231037
STDV 110 3.lcd	std 110 3	std 100furosemi	3243142
STDV 120 1.lcd	std 120 1	std 100furosemi	3610099
STDV 120 2.lcd	std 120 2	std 100furosemi	3609515
STDV 120 3.lcd	std 120 3	std 100furosemi	3526441
Average			3001290
%RSD			14.122
Maximum			3617890
Minimum			2347658
Standard Deviation			423848

ANNEXE IV : Chromatogrammes

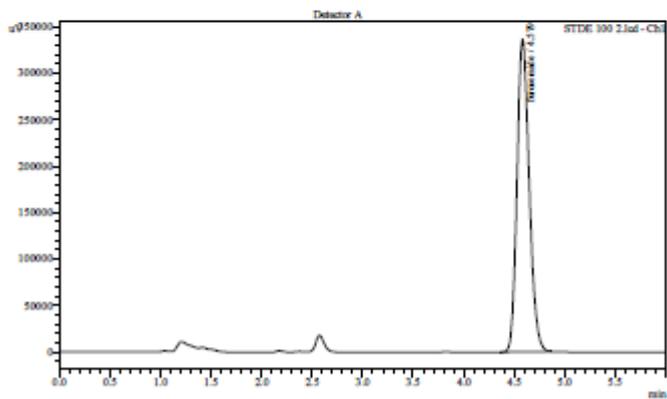
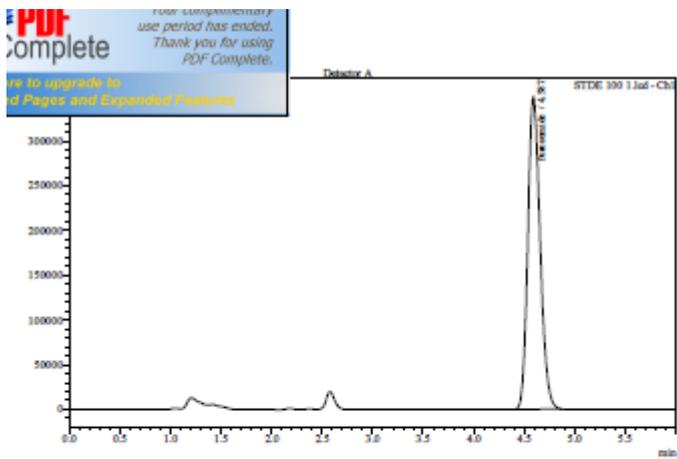
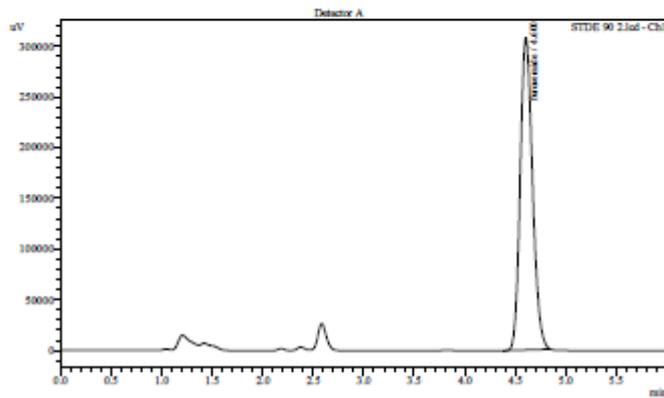
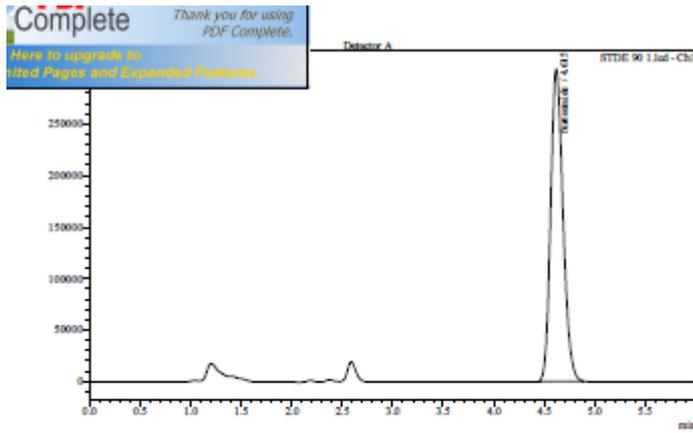
- Série 3 :

Sample Information

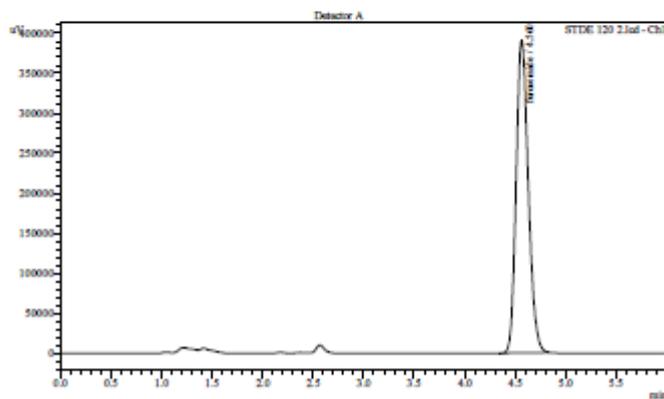
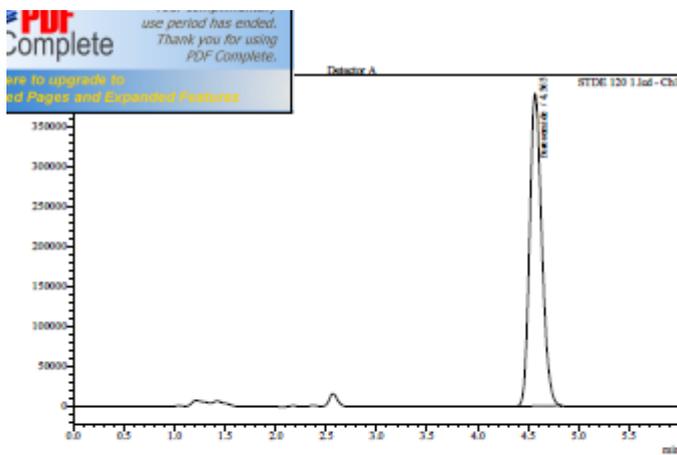
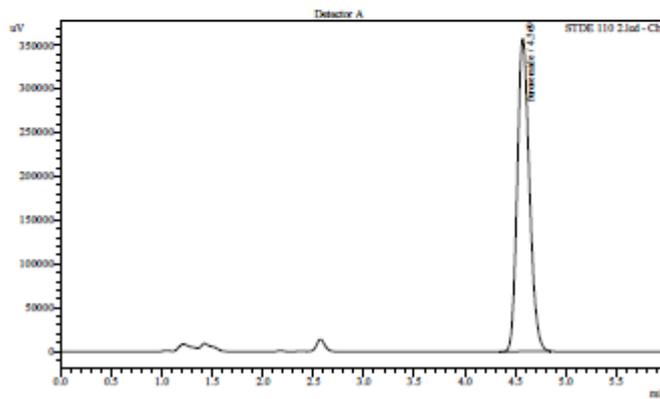
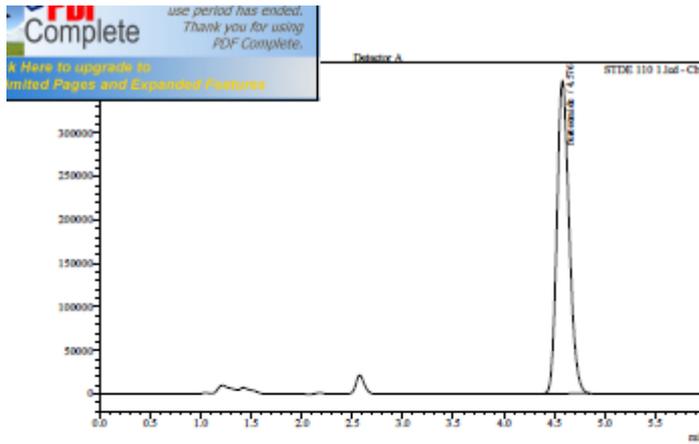
Acquired by : Admin
Sample Name : std 80 1
Sample ID : std 100furosemide 5eme
Tray# : 11
Vial# : 1
Injection Volume : 20 uL
Data Filename : STDE 80 1.lcd
Method Filename : furosemide.lcm
Batch Filename : serie3.lcb
Report Filename : Default.lcr
Date Acquired : 01/01/2006 04:04:26
Data Processed : 01/01/2006 01:09:53

Summary(Concentration)

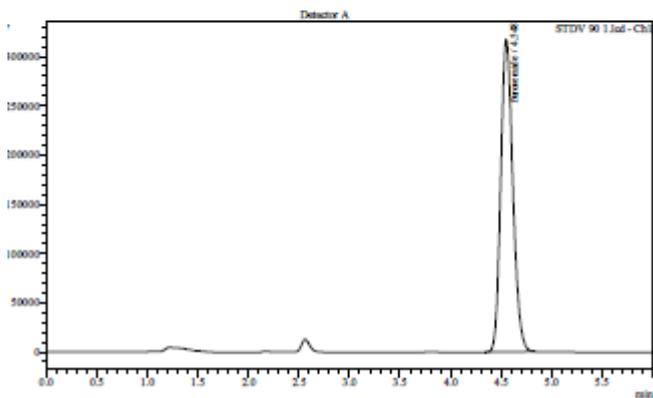
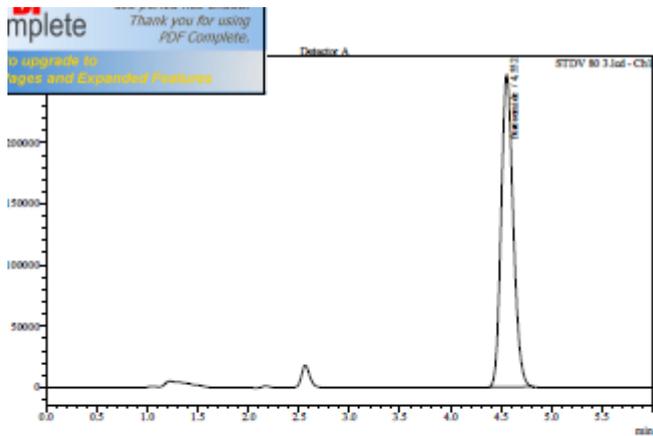
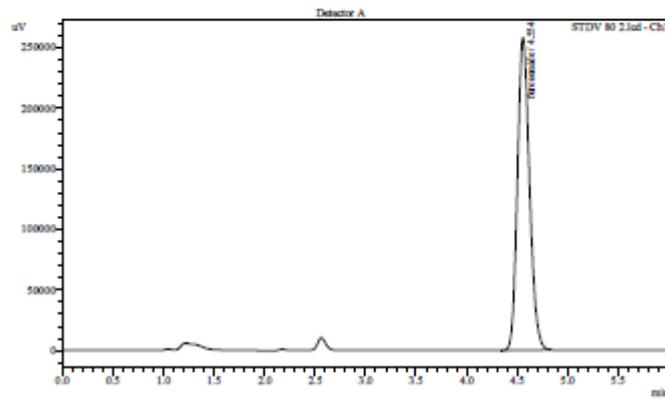
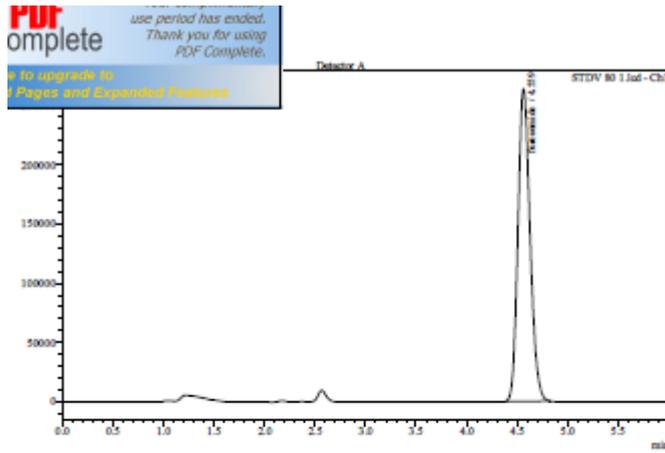
ANNEXE IV : Chromatogrammes



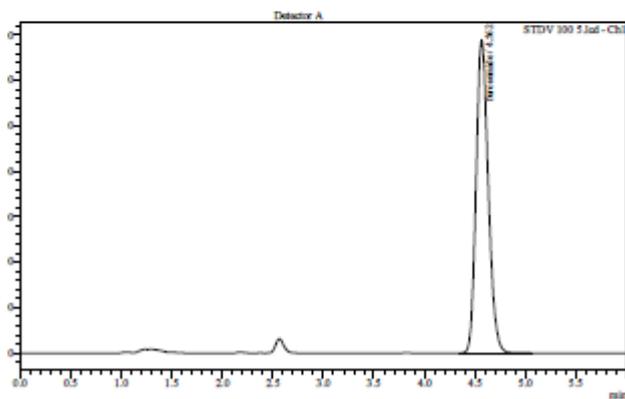
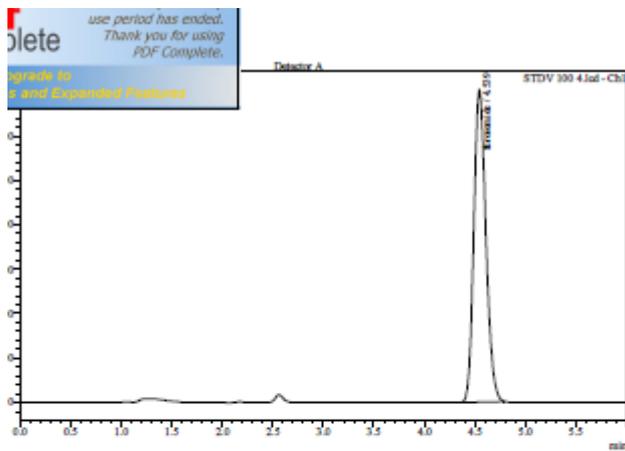
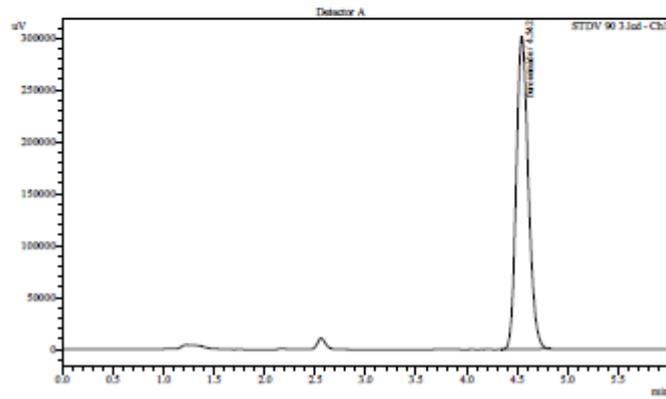
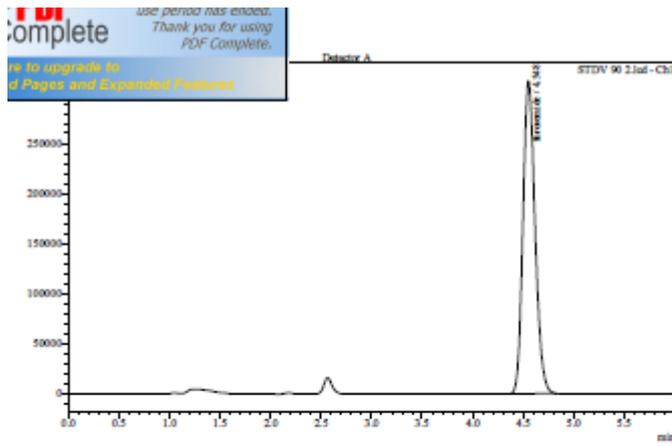
ANNEXE IV : Chromatogrammes



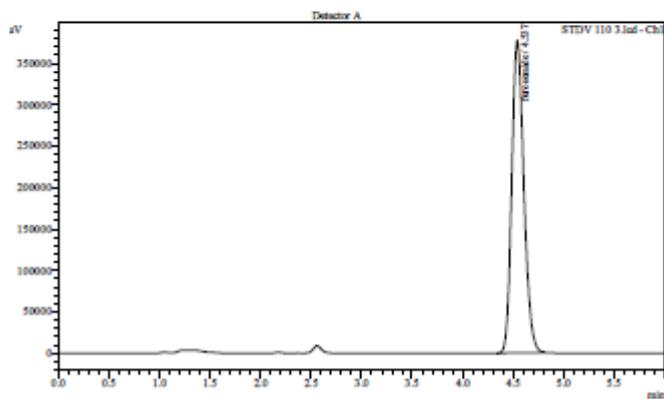
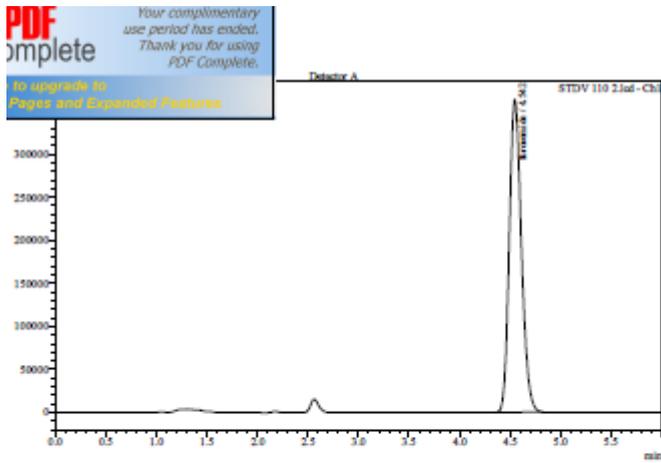
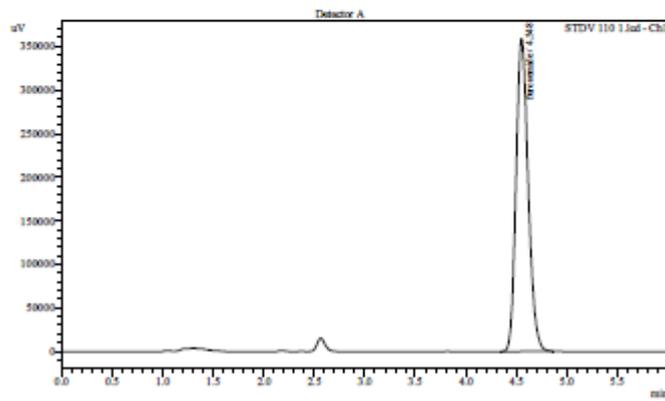
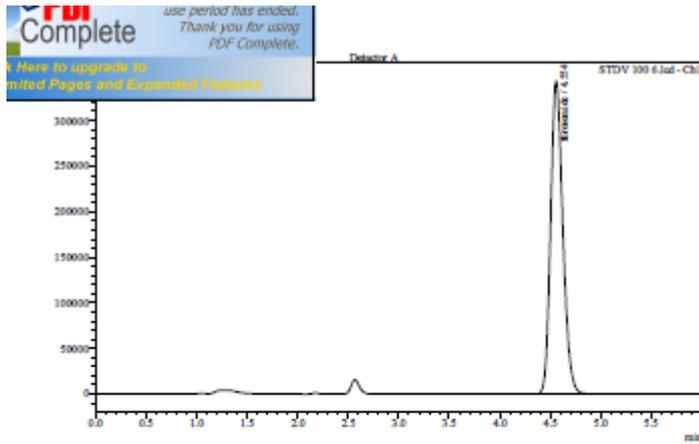
ANNEXE IV : Chromatogrammes



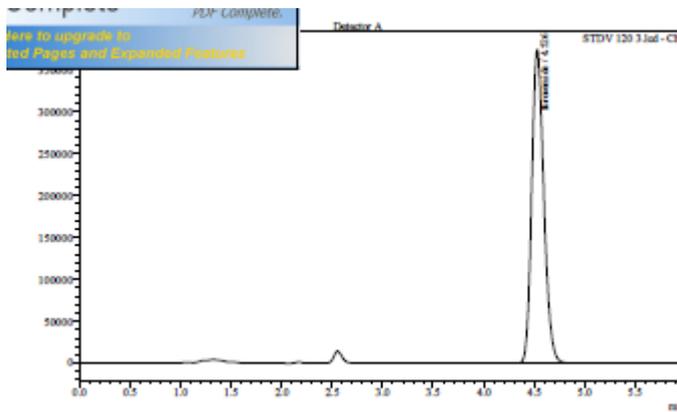
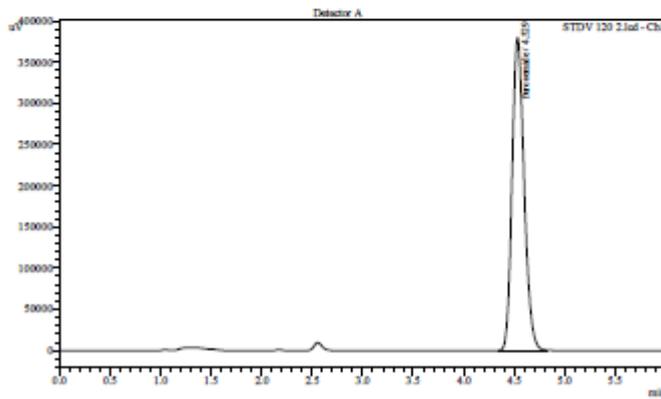
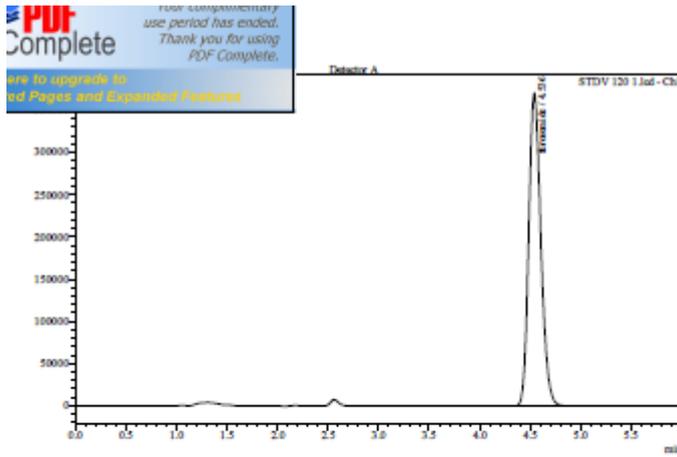
ANNEXE IV : Chromatogrammes



ANNEXE IV : Chromatogrammes



ANNEXE IV : Chromatogrammes



ANNEXE IV : Chromatogrammes

<< Detector A >>

Title	Sample Name	Sample ID	furosemide
STDE 80 1.lcd	std 80 1	std 100furosemi	2283672
STDE 80 2.lcd	std 80 2	std 100furosemi	2347922
STDE 90 1.lcd	std 90 1	std 100furosemi	2593195
STDE 90 2.lcd	std 90 2	std 100furosemi	2630582
STDE 100 1.lcd	std 100 1	std 100furosemi	2960781
STDE 100 2.lcd	std 100 2	std 100furosemi	2942655
STDE 110 1.lcd	std 110 1	std 100furosemi	3266181
STDE 110 2.lcd	std 110 2	std 100furosemi	3294575
STDE 120 1.lcd	std 120 1	std 100furosemi	3686964
STDE 120 2.lcd	std 120 2	std 100furosemi	3688415
STDV 80 1.lcd	std 80 12	std 100furosemi	2205483
STDV 80 2.lcd	std 80 2	std 100furosemi	2399888
STDV 80 3.lcd	std 80 3	std 100furosemi	2199679
STDV 90 1.lcd	std 90 1	std 100furosemi	2635326
STDV 90 2.lcd	std 90 2	std 100furosemi	2633331
STDV 90 3.lcd	std 90 3	std 100furosemi	2632276
STDV 100 4.lcd	std 100 1	std 100furosemi	2949099
STDV 100 5.lcd	std 100 2	std 100furosemi	2927726
STDV 100 6.lcd	std 100 3	std 100furosemi	2939088
STDV 110 1.lcd	std 110 1	std 100furosemi	3224762
STDV 110 2.lcd	std 110 2	std 100furosemi	3235419
STDV 110 3.lcd	std 110 3	std 100furosemi	3248090
STDV 120 1.lcd	std 120 1	std 100furosemi	3546115
STDV 120 2.lcd	std 120 2	std 100furosemi	3549732
STDV 120 3.lcd	std 120 3	std 100furosemi	3583780
Average			2779909
%RSD			12.790
Maximum			3272457
Minimum			2120492
Standard Deviation			355539

Résumé

Résumé

RESUME

Le contrôle analytique avant libération d'un médicament sur le marché est une étape importante et nécessaire pour garantir la qualité du produit qui va être délivré aux patients. Les laboratoires pharmaceutiques sont tenus de prouver que les méthodes utilisées lors de ce contrôle sont parfaitement valides et fiables, en procédant à leur validation.

Le but du présent travail est de mettre au point et de valider une méthode de dosage de Furosémide dans des comprimés par chromatographie liquide à haute performance en utilisant le profil d'exactitude couplé à l'intervalle de tolérance comme outil de décision de validation ; démarches harmonisées par une commission de la SFSTP parue en 2003 et en 2006 dans les guides STP Pharma Pratiques.

Nous avons initié ce travail par une étude bibliographique concernant le principe actif étudié et l'approche adoptée au cours de la validation de la méthode d'analyse.

Dans la partie expérimentale et pour la mise au point de la technique, nous avons effectué plusieurs tests afin d'optimiser les conditions analytiques,

Au début de la validation, nous avons pu démontrer la sélectivité de la méthode d'analyse en se basant sur le test de comparaison des pentes. Ensuite et après réalisation des expériences sur une gamme d'étalonnage et une gamme de validation, nous avons calculé les différents critères statistiques des différents modèles générés pour pouvoir construire les profils d'exactitude.

La méthode développée s'est révélée spécifique, linéaire, sensible, exacte dans l'intervalle [0.32 ; 0.48] mg/ml pour Furosémide avec un risque d'avoir au maximum de 5% des futurs mesures en dehors des limites d'acceptations fixées à [-5%, +5%]. Cela démontre la validité de la méthode et son aptitude à être appliquée en routine pour le dosage de Furosémide dans les comprimés dosés de 40 mg.

Mots clés : Furosémide, validation analytique, profil d'exactitude, intervalle de tolérance, HPLC

Abstract

ABSTRACT

Analytical control of a medicinal product before its release on the market is an important and necessary step to guarantee the quality of the product that is going to be delivered to patients. Pharmaceutical laboratories are required to prove that analytical procedures used for this control are highly valid and reliable, by performing an analytical validation.

The purpose of this work is to develop and validate a method for the determination of Furosemide in tablets using high performance liquid chromatography. The method is validated according to the approach of the total error proposed by SFSTP commission using accuracy profile as decision tool.

We started with a bibliographic study of the Furosemide and the approach adopted during the validation of the analytical protocol.

After that, before the validation step, we have demonstrated the selectivity of the analytical method using student test for the comparison of the two-slope with and without the matrix. Then, a series calibration and validation standard were used to calculate the different statistical criteria for the different models tested and the accuracy profiles were built for each model.

The results demonstrated that the developed method was accurate with good selectivity and linearity in the range of [0,32 ; 0,48] mg/ml for Furosemide with a risk of having a maximum of 5% of the future measurements outside the acceptance limits settled at [-5; +5] %. This confirms the validity of the developed method and its suitability for its routine application in the determination of Furosemide in the tablets of 40 mg.

Key words: Furosemide, analytical validation, accuracy profile, acceptance limits, HPLC.